

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**E.A.P DE MEDICINA VETERINARIA**

**Inmunodiagnóstico de neoplasias vesicales en bovinos con  
hematuria vesical en zoótica bovina utilizando la anti-  
citoqueratina y anti-vimentina**

**TESIS**

**Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario**

**AUTOR**

**Karim Mirella Montes Flores**

**Lima – Perú**

**2007**

# ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Definición de la hematuria enzoótica bovina	4
2.2. Etiopatogenia	4
2.3. Epidemiología	6
2.4. Signos clínicos	7
2.5. Lesiones macroscópicas	8
2.6. Lesiones microscópicas	9
2.7. Neoplasias	10
2.7.1. Neoplasias epiteliales	11
a. Papilomas vesicales	11
b. Carcinomas de células transicionales	11
* Carcinoma no infiltrante y no papilar	11
* Carcinoma papilar	12
* Carcinoma infiltrante y papilar	12
* Carcinoma infiltrante	12
c. Carcinoma de células escamosas	12
d. Adenocarcinomas	12
e. Carcinoma indiferenciado	13
2.7.2. Neoplasias mesenquimales	13
* Hemangioma	13
* Hemangiosarcoma	13
* Hemangiopericitosarcoma	14

---

2.7.3. Neoplasias mixtas	14
2.8. Importancia en salud pública	14
2.9. Definición de inmunohistoquímica	15
2.10. Antígenos, antigenicidad e inmunogenicidad	17
2.11. Anticuerpos	18
2.11.1. Anticuerpos policlonales	19
2.11.2. Anticuerpos monoclonales	20
2.12. Proteínas de los filamentos intermedios (IFP)	21
2.12.1. Citoqueratinas	23
2.12.2. Vimentina	26
2.13. Peroxidasa de rábano picante	28
2.14. 3,3' –diaminobenzidina (DAB)	29
2.15. Avidita-Estreptavidina y biotina	29
2.16. Métodos inmunohistoquímicos utilizando la técnica de inmunoperoxidasa	30
2.16.1. Método directo	30
2.16.2. Método indirecto de dos pasos	30
2.16.3. Método indirecto de tres pasos	31
2.16.4. Método de la Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP)	31
2.16.5. Métodos que utilizan la interacción Avidina-Biotina	32
a. Método de la Avidina-Biotina	32
b. Método del complejo Avidina-Biotina- Peroxidasa (ABC)	32
c. Método de la Estreptavidina-Biotina marcada (LSAB)	32
2.16.6. Método del polímero de dextrano marcado y conjugado con anticuerpos secundarios	33

---

---

2.17. Esquema de un proceso inmunohistoquímico	33
2.17.1. Preservación de antígenos	33
2.17.2. Recuperación antigénica-desenmascaramiento de antígenos	36
2.17.3. Bloqueo de uniones inespecíficas	38
2.17.4. Saturación de peroxidasas endógenas	39
2.17.5. Controles	39
2.17.6. Sensibilidad y especificidad	40
2.17.7. Adhesivos	41
2.18. Anticuerpos comerciales utilizados	41
2.18.1. Anti-citoqueratina	41
2.18.2. Anti-vimentina	41
2.19. Estudios previos	42
III. MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1. Lugar de estudio	44
3.2. Características de las muestras	44
3.3. Tamaño de las muestras	45
3.4. Materiales	45
3.5. Método inmunohistoquímico	47
3.5.1. Estreptavidina-biotina marcada (LSAB)	47
IV. RESULTADOS	50
4.1. Resultados inmunohistoquímicos	50
V. DISCUSIÓN	62
VI. CONCLUSIONES	65
VII. RECOMENDACIONES	66
VIII. LITERATURA CITADA	67

---

## LISTA DE CUADROS

N°	Título	Pág.
<b>Cuadro 1.</b>	Neoplasias vesicales urinarias de bovinos con HVEB según su diagnóstico histopatológico y grado de diferenciación.	47
<b>Cuadro 2.</b>	Reacción inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos Anti-Citoqueratina y Anti-Vimentina, según la clasificación de las neoplasias (incluye los Nidos Angioblásticos).	51

## LISTA DE FIGURAS

N°	Título	Pág.
<b>Figura 1.</b>	Carcinoma de células transicionales, hematoxilina-eosina.	52
<b>Figura 2.</b>	Carcinoma, Anti-Citoqueratina positivo (40x)	53
<b>Figura 3.</b>	Carcinoma, Anti-Citoqueratina positivo (40x)	54
<b>Figura 4.</b>	Carcinoma, Anti-Citoqueratina positivo (100x)	55
<b>Figura 5.</b>	Hemangiosarcoma, hematoxilina-eosina	56
<b>Figura 6.</b>	Hemangiosarcoma, Anti-Vimentina (40x)	57
<b>Figura 7.</b>	Hemangiosarcoma, Anti-Vimentina (40x)	58
<b>Figura 8.</b>	Hemangiosarcoma, Anti-Vimentina (100x)	59
<b>Figura 9.</b>	Nidos angioblásticos, Anti-Vimentina (40x)	60
<b>Figura 10.</b>	Nido angioblástico, Anti-Vimentina (100x)	60
<b>Figura 11.</b>	Muestra control, Anti-Citoqueratina positivo (10x)	61
<b>Figura 12.</b>	Muestra control, Anti-Vimentina positivo (10x)	61

## RESUMEN

En el presente estudio se procesaron 14 muestras embebidas en parafina de un total de 28 con procesos neoplásicos vesicales de bovinos con hematuria vesical enzoótica bovina (HVEB). De las 14 muestras: 01/14 ha sido diagnosticada como Papiloma, 04/14 como Carcinomas y 09/14 presentan en el mismo tejido vesical Carcinomas y Hemangiosarcomas, además de describirse en 02 muestras la presencia de “Nidos Angioblásticos”, que aparentemente son células endoteliales agrupadas con características de malignidad y se encontraron en el mismo tejido de dos Hemangiosarcomas. Por consiguiente, se tienen 5 muestras de neoplasias epiteliales, 3 de ellas bien diferenciadas y 2 poco diferenciadas; 9 neoplasias mixtas (epitelial y mesenquimal); de las epiteliales, 4 fueron bien diferenciadas y 5 poco diferenciadas; y de las mesenquimales, 6 fueron bien diferenciadas y 3 poco diferenciadas. Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó el Método Inmunohistoquímico de la Estreptavidina-Biotina Marcada con los anticuerpos comerciales pre-diluidos Anti-Citoqueratina, para el diagnóstico de las neoplasias epiteliales y mixtas (epitelial-mesenquimal) del lado epitelial; y la Anti-Vimentina para el diagnóstico de las neoplasias mixtas (epitelial-mesenquimal) del lado mesenquimal; y así corroborar el origen blastodérmico de las células neoplásicas y de los nidos angioblásticos mencionados. Los citoplasmas de las células neoplásicas de origen epitelial se tiñeron de color marrón con el anticuerpo Anti-Citoqueratina; asimismo, los citoplasmas de las células neoplásicas de origen mesenquimal se tiñeron de igual color con el anticuerpo Anti-Vimentina. Todas las células neoplásicas (incluyendo las poco diferenciadas) resultaron positivas al anticuerpo del cual se sospechaba su origen, corroborando al 100% su diagnóstico histopatológico. Las células de los “Nidos Angioblásticos” reaccionaron positivamente con el anticuerpo Anti-Vimentina confirmando su origen mesenquimal; por lo tanto, también se demuestra que son células endoteliales malignas en proliferación debido a sus características histopatológicas como estados primigenios al desarrollo de un hemangiosarcoma.

**Palabras Claves:** Bovinos, Vejiga, Inmunohistoquímica, HVEB, neoplasias, anti-citoqueratina, anti-vimentina.

## ABSTRACT

In the present study, 14 paraffin-embedded samples were processed, with a total of 28 samples with vesical neoplastic processes of cattle with bovine enzootic vesical hematuria (BEVH). Of the 14 samples: 01/14 has been diagnosed as papilloma, 04/14 as carcinomas, and 09/14 presented in the same bladder tissue, carcinoma and haemangiosarcoma, also described in 02 samples the presence of so-called "angioblastic nests", that are apparently endothelial cells grouped with features of malignancy and were found in the same tissue of two haemangiosarcomas. Therefore, there were 5 samples of epithelial neoplasms, including 3 well-differentiated and 2 poorly differentiated, 9 mixed tumors (epithelial and mesenchymal); of epithelial neoplasms, 4 were well differentiated and 5 poorly differentiated, and of mesenchymal neoplasms, 6 were well differentiated and 3 poorly differentiated. For the development of this work, there were used the immunohistochemical method of streptavidin-biotin marked with the pre-diluted commercial antibodies anti-cytokeratin, for the diagnosis of epithelial and mixed neoplasms (epithelial-mesenchymal) to the epithelial side, and the anti-vimentin in the diagnosis of mixed neoplasms (epithelial-mesenchymal) to the mesenchymal side, and thus corroborate the blastoderm origin of neoplastic cells and nests angioblastic mentioned. The cytoplasm of the neoplastic cells of epithelial origin were stained brown with anti-cytokeratin antibody; also, the cytoplasms of the neoplastic cells of mesenchymal origin were stained the same color with anti-vimentin antibody. All neoplastic cells (including poorly differentiated) were positive to antibody which was suspected source, corroborating to 100% the histopathological diagnosis of neoplasms diagnosed. The cells of the "angioblastic nests" reacted positively with anti-vimentin antibody confirming their mesenchymal origin and therefore also shown to be malignant endothelial cells proliferating due to its histopathologic features as primordial state to development of a haemangiosarcoma.

**Keywords:** bovines, vesical bladder, immunohistochemical, BEVH, neoplasms, anti-cytokeratin, anti-vimentin.



## I. INTRODUCCIÓN

La **Hematuria Vesical Enzoótica Bovina (HVEB)** es un proceso tóxico no infeccioso que se presenta en el ganado bovino por el consumo prolongado del helecho común ***Pteridium aquilinum (Pa)***, que ocasiona diversos procesos circulatorios, inflamatorios y neoplásicos, siendo estos últimos los de mayor importancia.

El ***Pa*** contiene una sustancia carcinógena llamada **Ptaquilósido (PT)**, que es un glucósido noresquiterpeno. El **PT** en el organismo se transforma en **Dienona** (el verdadero compuesto tóxico), el cual posee una función alquilante que se asocia químicamente con infinidad de proteínas que presentan terminales amino expuestos, que alteran a la proteína P53, que tiene por función regular la apoptosis celular; y por ende, no se produce la muerte de las células viejas y protoneoplásicas, desarrollándose todas las lesiones vesicales características de este proceso. Entre las lesiones de mayor relevancia tenemos a los papilomas, carcinomas, hemangiomas y hemangiosarcomas como las principales neoplasias vesicales.

En la HVEB, el inicio clínico de la enfermedad se presenta con una microhematuria imperceptible continuando después con una macrohematuria, emaciación, anemia, obstrucción vesical por los coágulos formados y disminución de la producción de leche. Por tales motivos el animal es sacrificado o se produce

la muerte natural del animal, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas en la población ganadera.

En estudios realizados en otros países, se comprobó la transmisión del **PT** a través de la leche de vacas que consumían el hebrecho **Pa**, corroborando un riesgo para la salud humana. En nuestro país se reportó la HVEB por primera vez a través de un estudio científico, desarrollado por Gonzáles (2003), en la provincia de Oxapampa-Pasco, caracterizando las lesiones anatomo-histopatológicas vesicales ocasionadas en esta enfermedad.

Debido a la gran variedad de neoplasias vesicales desarrolladas por este proceso, a los diferentes grados de malignidad, así como a los diversos orígenes blastodérmicos de ellas, se recurre a la **Técnica de Inmunohistoquímica**. Esta técnica utiliza la específica reacción que existe entre un antígeno y un anticuerpo marcado, en búsqueda de su comportamiento celular, además de corroborar el diagnóstico histológico de las neoplasias ya diagnosticadas por Gonzáles (2003), definiendo principalmente el origen celular de dichas neoplasias.

Para entender mejor, se tiene que saber que esta reacción se basa en la búsqueda de los filamentos intermedios, que vienen a ser los antígenos que se desean ubicar en la célula. Los anticuerpos son los anti-filamentos intermedios, que se encuentran con diferentes nombres comerciales. Pueden ser policlonales o monoclonales.

Los filamentos intermedios son proteínas que forman parte del citoesqueleto de las células. Existen 6 grupos de proteínas y cada grupo es específico para cada estirpe celular (con algunas excepciones), y son los siguientes: citoqueratinas tipo I, citoqueratinas tipo II, vimentina, desmina y proteína glial fibrilar ácida (tipo III), neurofilamentos (tipo IV), lámina nuclear (tipo V) y la nestina (tipo VI).

El grupo de las citoqueratinas varía según su peso molecular y el punto isoelectrico y se encuentran en el citoplasma de todas las células epiteliales

incluyendo a las células neoplásicas de origen epitelial. La vimentina es una sola proteína que se encuentra en las células mesenquimales, como por ejemplo en células endoteliales, fibroblastos, linfocitos, macrófagos, entre otras, y presentes también en las neoplasias de dichos orígenes.

En la búsqueda para determinar la estirpe celular de las neoplasias y no contando en la Medicina Veterinaria de nuestro medio con técnicas de diagnóstico más sensibles de las que se usan en rutina como la histopatología, el objetivo del presente trabajo fue utilizar la **Técnica de Inmunohistoquímica** para corroborar el diagnóstico de neoplasias vesicales en bovinos mediante la Anti-Citoqueratina y la Anti-Vimentina.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Definición de la hematuria vesical enzoótica bovina

La Hematuria Vesical Enzoótica Bovina (**HVEB**) es un proceso tóxico no infeccioso que afecta a los bóvidos en crianza al pastoreo y está circunscrita a zonas geográficas específicas. Viene a ser la principal forma clínica que posee el síndrome conocido como “Pteridiosis” o “Pteridismo” debido a que está relacionada al consumo continuo y por largos períodos del helecho común, taxonómicamente denominado ***Pteridium aquilinum (Pa)*** (Wiesner, 1973).

La HVEB está caracterizada por el desarrollo de lesiones hemangiomatosas de la pared de la vejiga urinaria y clínicamente por hematuria intermitente. La muerte suele ser causada por la anemia (Blood y Radostits, 1992).

### 2.2. Etiopatogenia

El **Pa** es una planta tóxica conocida como *helecho común*, ha sido registrado en todos los continentes y causa diferentes síntomas patológicos debido a que contiene 2 principales tóxicos: un componente carcinogénico radiomimético, el “norsesquiterpeno ptaquilósido” (Hirono *et al.*, 1984) y una tiaminasa tipo I (Evans, 1976). La tiaminasa produce una deficiencia de la tiamina (vitamina B1),

resultando nociva para los monogástricos como el equino, a quien le produce un síndrome nervioso-muscular (Evans, 1976; Blood y Radostits, 1992), lo cual no es un problema para los bovinos, ya que ellos sintetizan altos niveles de tiamina en el rumen, soportando bien la acción de la tiaminasa (Amstutz *et al.*, 1998).

Los recientes estudios demuestran una relación fuerte entre los papilomavirus y algunos clastogénicos, mutágenos y/o carcinógenos principales del Pa. El DNA del papilomavirus bovino tipo 2 (BPV-2) fue encontrado en tumores vesicales de bovinos que padecían de HVEB, de forma experimental en un 69% y de forma natural en un 46%. Este alto grado de la asociación entre los cánceres de la vejiga y el BPV-2 sugiere que este virus desempeña un papel en la oncogénesis de la vejiga (Campo *et al.*, 1992).

El **ptaquilósido (PT)** es un carcinógeno que se encuentra no sólo en el *Pteridium aquilinum*, sino también en el *Cheilanthes sieberi* y *Onychium contiguum* (Radostits *et al.*, 2002). El **PT** es un glucósido noresquiterpeno del tipo iludano que posee un anillo ciclopropánico altamente reactivo (Kushida *et al.*, 1994; Shahin *et al.*, 1999; Radostits *et al.*, 2002), que se utiliza para reproducir la depresión de la médula ósea, hematuria, neoplasias vesicales e intestinales y degeneración retiniana en animales de experimentación. Para que se produzca intoxicación han de ingerirse grandes cantidades de helecho. Otras citotoxinas de los helechos son la quercetina, el shilimato y el ciclohexanecarboxilato, aunque no se ha establecido relación alguna entre algunas de ellas y las enfermedades del ganado (Radostits *et al.*, 2002).

El **PT** al traspasar la barrera fisiológica del estómago e intestino del animal, es capaz de incorporarse al torrente sanguíneo y de allí distribuirse por todos los tejidos, incluyendo el hígado, el riñón y la vejiga urinaria que resulta particularmente afectada. Del mismo modo, puede traspasar la membrana celular y hasta nuclear. El PT es un compuesto termoinestable, que se descompone a un segundo derivado químico denominado **dienona**. Este nuevo material es el verdadero tóxico, ya que es poderosamente alquilante. Así, es capaz de asociarse

químicamente con infinidad de proteínas que poseen terminales amino expuestos, también a ácidos nucleicos y hasta al ADN (Alonso-Amelot *et al.*, 1995).

La dienona causará una alteración permanente e irreparable de los genes afectados. Si estos genes son aquellos que codifican la activación de otros genes, o una función especialmente sensible o reguladora de otros procesos bioquímicos, como por ejemplo, la **proteína P53**, encargada de regular la apoptosis o autodestrucción de aquellas células que funcionan anormalmente por cualquier deformidad metabólica, vejez, o incluso por ser protoneoplásicas. La invasión de la **dienona** estará propiciando la formación y multiplicación de tejido disfuncional o canceroso, de allí las profundas lesiones observadas patológicamente y el animal, en consecuencia, se hace inviable y muere (Shahin *et al.*, 1999).

### 2.3. Epidemiología

La intoxicación ocurre esporádicamente en la mayor parte de los países y produce mortalidad elevada en los bóvidos, mientras que los óvidos son menos sensibles a esta forma de intoxicación. (Blood y Radostits, 1992). En las zonas endémicas puede estar afectado más del 90% del ganado adulto.

Existen dos subespecies de helecho, *Pteridium aquilinum ssp. aquilinum*, con ocho variedades, y el *P. aquilinum ssp. caudatum*, con cuatro variedades, pero se desconoce si todas las variedades son tóxicas (Jubb *et al.*, 1991). La enfermedad aparece luego que las plantas son consumidas en grandes cantidades y por varios meses. Las manifestaciones por intoxicación difieren en los animales poligástricos y monogástricos (Carlyle y Duncan, 1990).

En el Perú se ha reportado la “hematuria enzoótica” de una manera irregular, sin un estudio científico apropiado, en Pucallpa, los Valles del Huallaga (San Martín), Pichis Palcazu (Pasco) y en Oxapampa (Pasco); en esta última ciudad se realizó el primer reporte científico, mediante un estudio anatómo-histopatológico

de las lesiones producidas por la HVEB, comprobándose la existencia de esta enfermedad (González, 2003).

La toxicidad de las plantas varía en gran medida según su distribución geográfica dentro de cada país. Por ejemplo, la concentración del PT de las plantas del sur de Australia puede ser el doble que las del norte, lo que indica una variación genética (Radostits *et al.*, 2002). La toxicidad también varía según la fase de crecimiento y la estación del año, siendo más tóxicas las plantas más jóvenes. Los tallos subterráneos (rizomas) y las frondas recién rizadas (báculos) del helecho contienen concentraciones cinco veces mayores que las de las frondas maduras, que han sido utilizados para producir enfermedad experimental en las vacas (Blood y Radostits, 1992; Radostits *et al.*, 2002).

El helecho es más prolífico y más peligroso en los suelos arenosos ligeros, donde su gran tolerancia climática y de tipos de suelo hace que domine el pasto con gran rapidez. Aparecen tras una sequía, fuego o cuando el forraje es escaso. En estas circunstancias es muy difícil de controlar o erradicar (Radostits *et al.*, 2002).

En Oxapampa, el helecho común crece mayormente en los distritos que se encuentran sobre los 1000 msnm, en zonas de suelos pendientes y terrazas altas, alejadas de la rivera de los ríos, con suelos pobres en minerales importantes como son el calcio y fósforo, pero a su vez con niveles altos de aluminio y con un pH ácido (3.5-5.5) (López, 1983).

## **2.4. Signos clínicos**

Dependiendo del período durante el cual la planta es ingerida y la cantidad consumida, el principal radiomimético da tres diferentes figuras clínico-patológicas, observadas comúnmente en las vacas: diátesis hemorrágica, hematuria enzoótica bovina y carcinomas del tracto digestivo alto (Vargas *et al.*, 2003).

El principal signo clínico de la HVEB es la hematuria, que viene a ser la presencia de sangre total en la orina. La hematuria en una fase inicial puede ser imperceptible (microhematuria), paulatinamente la orina se irá tornando oscura, pasando por emisiones intermitentes de orina enrojecida (macrohematuria) hasta llegar a la eliminación de gran cantidad de coágulos de sangre, lo cual irá acompañado de disuria y tenesmo, por el esfuerzo que deberá de realizar el animal para miccionar. Incluso en ocasiones los coágulos producirán un proceso obstructivo que es fatal. A pesar de esto, la enfermedad también puede cursar con períodos sin hematuria y volviendo a presentarse un tiempo después. Otros signos importantes vienen a ser la emaciación, debilidad general, mucosas pálidas y la caída de los niveles de producción de leche (Blood y Radostitis, 1992; Amstutz *et al.*, 1998).

En un estudio experimental realizado en ganado bovino, la prominente hematuria ocurrió a los 60 días después del inicio de la alimentación con *P. aquilinum*. La anemia y los cambios en leucocitos eran las últimas manifestaciones. Los papilomas aparecieron a partir del primer año, mientras que los carcinomas invasores no se convirtieron hasta 2.6 años después del inicio de la alimentación (Pamukcu *et al.*, 1976).

## **2.5. Lesiones macroscópicas**

En las fases iniciales de la HVEB, la actividad vascular y las lesiones ulcerativas en la vejiga urinaria son aún incipientes y relacionadas a períodos de microhematuria. En fases más avanzadas, en la mucosa de la vejiga urinaria se desarrollan áreas focales o difusas de color rosado, asociadas a nodulaciones hemangiomatosas y pedunculadas, que presentan sobre su superficie severas hemorragias, las cuales producirán macrohematuria. En algunos animales, ésta se observa sin la presencia de neoplasias, pero generalmente es causada por



procesos neoplásicos que se ulceran y sangran profusamente hacia la luz del órgano (Jubb *et al.*, 1991).

Los tumores probablemente se originan a partir del epitelio de transición y a menudo se advierten en ellos signos de malignidad, metástasis hacia los ganglios linfáticos regionales y pulmonares; el resto del aparato urinario no está afectado a pesar de las lesiones en uréteres y pelvis renal (Blood y Radostits, 1992). Las lesiones vesicales encontradas son mayormente de tipo multifocal, entre estas destacan formaciones nodulares prominentes sobre la mucosa, procesos verrucoides, papilomatosos y focos rojizos de extravasación sanguínea (Gonzáles, 2003).

## 2.6. Lesiones microscópicas

Las lesiones en la vejiga urinaria son patognomónicas porque no existe otra patología en los bovinos que ocasiona múltiples alteraciones histológicas como: hiperemia, telangectasia, infiltrados leucocitarios, edema, hemorragias, úlceras, endoarteritis obliterans, separación del endotelio vascular y cambios proliferativos de la mucosa (Moulton, 1978). Estas alteraciones se pueden presentar antes o al mismo tiempo que las neoplasias, como hemangiomas, hemangiosarcomas, carcinomas transicionales, papilomas, adenomas y fibromas (Radostits *et al.*, 2002).

Gonzáles en el año 2003 reportó por primera vez unas estructuras conformadas por vasos sanguíneos tortuosos en proliferación, localizados en la lámina propia, en el mismo tejido acompañando a los hemangiosarcomas, que por la característica de neoformación vascular, se consideró denominarlos “**Nidos Angioblásticos**” (46%), los cuales serían futuros procesos neoplásicos vasculares o entes nutricios de neoplasias de otras estirpes, pero que definitivamente muestran una actividad celular endotelial exacerbada.

## 2.7. Neoplasias

La naturaleza de los tumores vesicales, asociados con la ingestión de *P. aquilinum*, es absolutamente peculiar. Tanto los tumores epiteliales como mesenquimales han sido descritos, al lado de la extraña capacidad para inducir diferentes neoplasias en el mismo animal (Tokarnia *et al.*, 2000). Pueden coexistir múltiples tumores de más de un tipo y en más del 50% del ganado afectado se desarrollan neoplasmas epiteliales-mesenquimales mixtos (Jubb *et al.*, 1991).

Pamukcu *et al.* (1976), encontraron que los tumores de la vejiga de vacas con HVEB desarrollados naturalmente o inducidos (alimentadas con *P. aquilinum*) fueron de origen epitelial (35%) o mixtos epiteliales y estromales (55%). Los papilomas ocurrieron en el 24% y los carcinomas en el 61% de los casos que se desarrollaron naturalmente, mientras que había papilomas (40%) y carcinomas (50%) en vacas alimentadas con el helecho. Los tumores desarrollados naturalmente eran metastásicos a los nódulos regionales y al pulmón. No se detectó ninguna metástasis en vacas alimentadas con Pa.

En Perú se reporta, del total de 28 muestras de neoplasias vesicales diagnosticadas en ganado bovino con HVEB, que el 42% fueron epiteliales y el 58% fueron no epiteliales. De las epiteliales se tiene lo siguiente: carcinomas "in situ" (27%), papilomas mucosos (10%) y carcinomas transicionales (10%). De las muestras no epiteliales se tiene: hemangiosarcomas (34%), hemangiomas (24%) y mixosarcomas (14%). Se reportó también 34% de neoplasias mixtas (Gonzáles, 2003).

En Brasil se encontraron en muestras de vejigas de ganado bovino con HVEB, un 44% de carcinomas de células transicionales, 42.3% de carcinomas "in situ", 16.9% de papilomas de células transicionales, 10.1% de adenomas, 16.9% de carcinomas epidermoides y 8.4% de adenocarcinomas. Los tumores mesenquimales se presentaron en un alto número de neoplasias vasculares

(84.7%), 25.4% de hemangiosarcomas y 59.3% de hemangiomas (Vargas *et al.*, 2003).

### **2.7.1. Neoplasias epiteliales**

Normalmente la mucosa de la vejiga urinaria está compuesta por 3-6 capas de células epiteliales transicionales (Pamukcu, 1974). Dentro del grupo de neoplasias vesicales epiteliales tenemos:

**a. Papilomas vesicales:** son definidos como tumores papilares que tienen un delicado estroma fibrovascular cubierto por epitelio transicional indistinguible del epitelio vesical normal y de no más que 6 capas de células. Las células individuales son delgadas y elongadas, paralelas unas a otras y perpendicularmente a la membrana basal, contienen figuras mitóticas normales y no hay evidencia de invasión. El diagnóstico histológico del papiloma se basa en una completa ausencia de anaplasia celular (Pamukcu, 1974).

**b. Carcinomas de Células Transicionales:** histológicamente pueden adoptar una forma sólida o papilar, puede ser semejantes al epitelio transicional o exhibir un alto grado de anaplasia. Pueden ser simples o múltiples. Los tumores múltiples son papilares y tienen una variedad en tamaño y apariencia. Algunos pueden ser casi microscópicos y otros llenar la vejiga totalmente con crecimientos protuberantes o pueden extenderse en la mayor parte de la superficie del urotelio. En general pueden ser subdivididos en 4 grupos:

- **Carcinoma no infiltrante y no papilar,** las células tumorales están entre el urotelio que las origina sin la invasión de la membrana basal, son los llamados *carcinomas in situ* (Pamukcu, 1974).

- ***Carcinoma papilar***, crecen en dirección al lumen y se asemejan a un papiloma teniendo su base relativamente más gruesa, sin invadir el estroma. El crecimiento puede tener un patrón como el de una “coliflor”. Microscópicamente el carcinoma papilar tiene una cubierta urotelial gruesa, el urotelio que cubre muestra un crecimiento de células que no son uniformes, se agrupan y están estratificadas irregularmente, con la presencia de núcleos atípicos, anaplasia, células gigantes y figuras mitóticas (Pamukcu, 1974).
  - ***Carcinoma infiltrante y papilar***: es muy semejante al anterior pero invade el estroma de sus ramificaciones y la lámina propia del tejido (Pamukcu, 1974).
  - ***Carcinoma infiltrante***: crece penetrando la pared de la vejiga y usualmente aparecen como lesiones planas o como una mancha ulcerada infiltrando el urotelio. Microscópicamente está compuesto por células transicionales formando nidos o cordones cohesivos. Los patrones citoplasmáticos y nucleares varían ampliamente (Pamukcu, 1974).
- c. Carcinomas de células escamosas**: generalmente resultan de la epidermización de una neoplasia de células transicionales, apreciándose una fuerte queratinización, histológicamente son características sus perlas córneas (Pamukcu, 1974).
- d. Adenocarcinomas**: que pueden segregar mucina, se originan del epitelio metaplásico. Esta metaplasia puede asociarse a la toxicidad (Carlyle y Duncan, 1990).

**e. Carcinoma indiferenciado:** como algunos tumores, es imposible reconocer el tipo celular de origen. Este termino indiferenciado se refiere al tipo de epitelio y no al grado de anaplasia (Pamukcu, 1974).

En un estudio de una muestra de vejiga urinaria con HVEB, caracterizaron un carcinoma *in situ*, encontrando células cancerígenas redondas mezcladas con el urotelio normal; dichas células eran anaplásicas, presentes en todas las capas, con citoplasma anfófilico y núcleos pleomórficos con gránulos, cromatina irregular dispersada, muchos nucleolos grandes y numerosas figuras mitóticas. La pérdida celular de las capas superficiales hizo a las células tumorales más evidentes. Las áreas neoplásicas focales demostraron las células aisladas y/o arracimadas grandes con citoplasma acidófilo pálido, los núcleos grandes con los nucleolos solos o múltiples y las fronteras bien definidas que se asemejaban a las *células de Paget*, que se encuentran en la Enfermedad de Paget Mamario (un tipo de neoplasia mamaria). Los cambios “pagetoides” en los sitios extramamarios son raros y la localización más común de la enfermedad de Paget extramamaria (EPD) es la vulva, siendo la región perianal el segundo sitio más común. Se ha descrito por primera vez la variante pagetoide del carcinoma urotelial de la vejiga urinaria de un bovino con HVEB (Borzacchiello *et al.*, 2001).

### 2.7.2. Neoplasias Mesenquimales

Las **Neoplasias Vasculares** vienen a ser la mayoría de neoplasias mesenquimales, observadas en la HVEB. Se tiene la siguiente clasificación:

- **Hemangioma:** se caracterizan por formar espacios vasculares dilatados, llenos de sangre, delimitados por una pared de células endoteliales ligeramente hipertrofiadas, con márgenes demarcados pero no encapsulados (Moulton, 1978).
- **Hemangiosarcoma:** está compuesto por células endoteliales inmaduras que forman espacios vasculares tortuosos, estas células varían en forma y tamaño,

mayormente son alargadas con núcleos redondos u ovoides, hipercromáticos y figuras mitóticas (Moulton, 1978).

- **Hemangiopericitosarcoma:** las células neoplásicas forman láminas concéntricas no sólo alrededor de los vasos sanguíneos, sino también alrededor de los paquetes de colágeno y fibroblastos (Moulton, 1978).

### **2.7.3. Neoplasias mixtas**

Son aquellas que poseen al mismo tiempo neoplasias tanto de origen epitelial como de origen mesenquimal, lo cual es muy frecuente encontrar en animales que padecen HVEB (Pamukcu, 1974; Gonzáles, 2003).

## **2.8. Importancia en salud pública**

Es posible que exista un nexo entre el helecho carcinogénico y el cáncer gástrico humano, el cual podría ser la leche. En efecto, experimentos preliminares lograron demostrar que la leche de vacunos expuestos a dietas con **Pa** inducían diversos carcinomas a ratas cuando se la incluía en su dieta (Alonso-Amelot *et al.*, 1993).

El proceso comienza con el helecho en el potrero, al comérselo los animales ingieren una cantidad sustancial del ptaquilósido, 10 g por día o más, que excretan en parte (hasta cerca del 10%) por la leche en los siguientes días. De modo que, si alguien toma dos vasos de leche de una vaca que ha comido 7 kg de helecho conteniendo aproximadamente 5 g de **PT**, y que produce unos 20 litros/día de leche, esa persona estará ingiriendo entre 2 y 10 mg de este potente carcinogénico. Parte del **PT** será destruido por la acidez del estómago humano, pero parte puede ser absorbido por las paredes antes que se destruya y causar a largo plazo sus efectos (Alonso-Amelot, 1999).

El *P. aquilinum* es un vegetal consumido frecuentemente por la población en Japón y en un estudio caso-control realizado en ese país se encontró una incidencia de casos de cáncer al esófago 2.1 veces mayor en las mujeres y 3.7 mayor en los hombres que ingieren esta planta diariamente, comparados con los que la ingieren esporádicamente en las localidades de Nara, Miye y Wakayama (Hirayama, 1979). En Brasil, en un estudio epidemiológico caso-control, se detectó que las personas que ingieren **Pa** tienen un riesgo 3.4 y 3.45 mayor de desarrollar cáncer de esófago y de estómago respectivamente, que las personas que no lo consumen (Marliere *et al.*, 1998).

En Costa Rica, país que posee una de las tasas de incidencia de cáncer gástrico más alta del mundo, se encontró que poblaciones de las regiones altas, con potreros invadidos por **Pa**, sufren una tasa de incidencia de cáncer de estómago 2.73 veces mayor que la población que habita en las zonas bajas libre de **Pa** (Villalobos-Salazar *et al.*, 1989). El **PT** aparece en la leche de las vacas 54 horas después de la ingesta del **Pa**, alcanzando el pico de mayor concentración a las 78 horas y disminuyendo en un 50% a las 115 horas. La pasteurización y la cocción disminuyen los niveles de ptaquilósidos en la leche en un 47% y 74%, respectivamente (Villalobos-Salazar *et al.*, 2000).

## 2.9. Definición de inmunohistoquímica

La Inmunohistoquímica (**IHQ**) es una técnica avanzada de histoquímica, relativamente joven, que causó un gran impacto en patología, oncología e histología durante la década pasada debido a que produjo altos niveles de especificidad (Elias, 1990). La IHQ es un método que utiliza anticuerpos seleccionados para identificar antígenos específicos. Las pruebas son extremadamente sensibles y pueden detectar cantidades muy pequeñas de una sustancia (Mills, 1980; Van Noorden y Polak, 1983).

Esta técnica se inició verdaderamente cuando, *A. H. Coons* y colaboradores tuvieron la idea de localizar sustancias en tejidos utilizando anticuerpos específicos marcados con un colorante fluorescente llamado “isocianato de fluoresceína”. Al principio marcaron el anticuerpo específico (Método Directo) introduciendo después el Método Indirecto que es más específico y versátil, reemplazando al “isocianato” por “isotiocianato” el cual es más fácil de unirse a los anticuerpos y se ha mantenido como el marcador fluorescente de preferencia. Las desventajas de este método indirecto es que se necesita un microscopio fluorescente, los detalles de fondo no se pueden distinguir y las preparaciones no son permanentes porque las marcas fluorescentes no soportan la deshidratación (*Van Noorden y Polak, 1983*). Actualmente la IHQ se ha convertido, como predijeron muchos patólogos, en la técnica auxiliar más importante para la hematoxilina-eosina (*Pardo et al., 1998*).

Los marcadores tumorales juegan un rol importante en la histogénesis de los tumores indiferenciados. Los estudios de IHQ hacen posible determinar el origen de los tumores, estos tumores pueden ser clasificados por anticuerpos o sustancias como filamentos intermedios, hormonas, enzimas, antígenos del grupo sanguíneo e inmunoglobulinas que sirven como marcadores para tejidos o tipos celulares particulares (*Elias, 1990*).

En el proceso de IHQ el tejido congelado o desparafinado y rehidratado se recubre con un anticuerpo primario bien caracterizado y específico dirigido contra un antígeno de valor diagnóstico. Tras una incubación controlada y la posterior eliminación del reactivo primario, los cortes del tejido se exponen a un segundo anticuerpo de especificidad genérica para el primero. Este último anticuerpo puede marcarse con biotina, proporcionando un puente para la posterior unión de un complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa de rábano que completa el conjunto inmunohistoquímico. La enzima peroxidasa puede utilizarse así para catalizar una reacción de oxidación-reducción en presencia de un colorante que precipita en el lugar donde se ha fijado el anticuerpo. Después se aplica la técnica de tinción de



contraste que va a resaltar los detalles morfológicos. Posteriormente se comprueba la presencia del antígeno en cuestión estudiando los cortes del tejido en el microscopio óptico (Murphy *et al.*, 1996).

Se debe subrayar que la inmunohistoquímica no nos permite diferenciar entre tumores malignos y benignos; su objetivo principal consiste en distinguir neoplasias similares desde un punto de vista microscópico, para dar un diagnóstico exacto; debido a que tienen un pronóstico o tratamientos diferentes (Murphy *et al.*, 1996).

## **2.10. Antígenos, antigenicidad e inmunogenicidad**

Un antígeno (**Ag**) es toda sustancia o partícula animada o inanimada, de cualquier constitución química, que introducida a un organismo superior por cualquier vía o perteneciente al mismo, no sea reconocida como propia e induzca en éste una respuesta humoral y/o celular detectables tanto *in vivo* como *in vitro* (Mills, 1980; Gimeno *et al.*, 2002). En IHQ, el antígeno es la sustancia que tratamos de demostrar (Mills, 1980).

Existen algunas condiciones para que un Ag tenga capacidad antigénica. Las partículas más antigénicas son las moléculas más pesadas, rígidas y químicamente complejas; entonces son más antigénicas que otras cuanto más alejado filogenéticamente esté el Ag con respecto al organismo donde se desarrollará la respuesta orgánica. La vía de entrada y la dosis de Ag también son elementos que hacen la antigenicidad del mismo (Gimeno *et al.*, 2002).

Las partículas complejas, tales como bacterias o células no constituyen un Ag simple, sino que son una mezcla compleja de proteínas, glicoproteínas, polisacáridos y lípidos. Cuando se monta una respuesta inmune contra estas partículas, en realidad se están produciendo un gran número de respuestas antigénicas simultáneas (Gimeno *et al.*, 2002).

Se pueden diferenciar dos características primordiales en un antígeno. Por una parte la ***inmunogenicidad***, que es la habilidad para inducir la formación de anticuerpos y la ***antigenicidad o reactividad específica***, que es la particularidad del antígeno de hacer que éste sea reconocido por un determinado anticuerpo. La reacción antígeno-anticuerpo es una de las más específicas en biología y esta es la razón por la que las reacciones inmunohistoquímicas son más precisas que las ordinarias técnicas histoquímicas (Bourne, 1983).

A la región del antígeno reconocida por un anticuerpo se le denomina epítopo o determinante antigénico. Un antígeno puede presentar un número variable de epítomos de estructura única o repetitiva. La complejidad estructural de las proteínas favorece que éstas presenten por lo general un número elevado de epítomos distintos, mientras que los ácidos nucleicos y los polisacáridos, dada su repetitividad estructural, poseen un número escaso de epítomos diferentes (Bourne, 1983).

Entonces, un antígeno es una sustancia extranjera al anfitrión que estimula la formación de un anticuerpo específico y que reaccionará con el anticuerpo producido. Esta reacción implica la formación de los complejos inmunes abarcando varias moléculas del antígeno y del anticuerpo. Estos complejos pueden convertirse en precipitados muy grandes y de tal forma que se pueden medir por varias técnicas (Bourne, 1983).

## **2.11. Anticuerpos**

El reactivo fundamental común a todas las técnicas inmunohistoquímicas es el anticuerpo. La disponibilidad de antisueros, fracciones de inmunoglobulina y anticuerpos monoclonales para un número cada vez mayor de antígenos tisulares útiles clínicamente, ha expandido enormemente la cantidad y calidad del repertorio inmunohistológico (Boenisch, 2001).

Los anticuerpos pertenecen a un grupo de proteínas llamadas inmunoglobulinas (Ig). Las Ig abarcan cinco clases: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Cada inmunoglobulina esta compuesta de dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos cadenas livianas idénticas (L). Las cadenas H difieren en las propiedades antigénicas y estructurales y determinan la clase y subclase de molécula. Las dos cadenas L son de clase *kappa* o de clase *lambda*. La distribución de cadenas *kappa* y *lambda* difiere de cada clase y subclase de Ig, así como también entre diferentes especies. Los puentes de disulfuro unen en forma covalente las cadenas L a H y H a H. Al participar en la estructura terciaria, le confieren mayor estabilidad a la molécula de inmunoglobulina (Boenisch, 2002).

Las soluciones de anticuerpos utilizados en IHQ contienen mayormente el anticuerpo IgG y en menor cantidad las otras clases de inmunoglobulinas (Bourne, 1983; Boenisch, 2002).

La IgG está compuesta de dos cadenas pesadas (H) *gamma* y dos cadenas livianas (L) de tipo *kappa* o de tipo *lambda*. Estas cadenas están compuestas de dominios variables (V) y dominios constantes (C), cada dominio contiene de 110 a 120 aminoácidos y se unen por medio de puentes disulfuro inter- e intra-cadena. En el dominio variable de la cadena liviana (VL) y en el dominio variable de la cadena pesada (VH) se forma el sitio de unión con los antígenos. Varias regiones hiperactivas (HV) están localizadas dentro del dominio VL y VH del anticuerpo. Durante su reacción con los antígenos las regiones HV se ubican muy cercanas al determinante antigénico (epítipo), entre el antígeno y las regiones HV se localizan especificidades estructurales únicas llamadas determinantes idiotípicos. Cada clon de anticuerpo expresa su propio idiotipo (Boenisch, 2002).

### **2.11.1. Anticuerpos policlonales**

Los anticuerpos policlonales son producidos por diferentes células plasmáticas y en consecuencia, son disimilares inmunohistoquímicamente; estos reaccionan con varios epítipos sobre el antígeno para el que fueron originados. El animal más

frecuente utilizado para la producción de anticuerpos policlonales es el conejo, seguido por la cabra, cerdo, oveja, caballo, conejillo de indias y otros. La popularidad de los conejos para la producción de anticuerpos policlonales se atribuye principalmente a su fácil mantenimiento (Bourne, 1983; Boenisch, 2002).

### **2.11.2. Anticuerpos monoclonales**

Los anticuerpos monoclonales son el producto de un clon individual de células plasmáticas. Estos anticuerpos son idénticos inmunológicamente y reaccionan con un epítipo específico en el antígeno contra el cual han sido originados. Es probable que por razones de economía los ratones sean actualmente usados casi exclusivamente para la producción de anticuerpos monoclonales. Después que se ha logrado una respuesta inmune, los linfocitos B del bazo o ganglio linfático son cultivados y fusionados con células del mieloma no secretor de ratón bajo condiciones específicas. Mientras que los linfocitos B transfieren el anticuerpo específico, las células del mieloma le conceden longevidad en el medio de cultivo a las células híbridas (hibridomas). Las células B no reactivas y las células del mieloma son descartadas y el hibridoma productor de anticuerpos es cultivado y probado para lograr la reactividad deseada. El crecimiento del hibridoma puede ser llevado a cabo en un medio de cultivo o por trasplante del hibridoma en la cavidad peritoneal de ratón singénico de donde se colectan los anticuerpos del líquido ascítico. Con este procedimiento pueden producirse grandes cantidades, o teóricamente al menos, cantidades ilimitadas de anticuerpos monoclonales de características específicas (Boenisch, 2002).

En inmunohistoquímica los anticuerpos monoclonales poseen ciertas ventajas sobre sus contrapartes policlonales. Estas incluyen alta homogeneidad, ausencia de anticuerpos inespecíficos, facilidad de caracterización y ausencia de variabilidad de partida a partida o de lote a lote (Boenisch, 2002).

## 2.12. Proteínas de los filamentos intermedios (IFP)

El citoplasma de todas las células eucariotas contiene una malla estructural de fibrillas compuesta de tres tipos de elementos intracelulares llamado citoesqueleto: microfilamentos, filamentos intermedios y microtubulos (Elias, 1990). Los filamentos intermedios están compuestos por diversas proteínas que se expresan en distintos tipos de células, tienen por función proporcionar un andamiaje que integra a los componentes del citoesqueleto y organizar la estructura interna de la célula (Cooper, 2002). Más de 50 diferentes IFP han sido identificadas y clasificadas en seis grupos en función a las similitudes entre sus secuencias de aminoácidos:

- **Tipos I y II:** son dos grupos de *citoqueratinas*, constituidos cada uno por aproximadamente 15 proteínas diferentes, que se expresan en las células epiteliales. Cada tipo de célula epitelial sintetiza al menos una citoqueratina **Tipo I (ácida)** y una de **Tipo II (neutra/básica)**, que copolimerizan para formar filamentos. Algunas citoqueratinas de tipo I y II (denominadas duras) son constituyentes estructurales tales como pelo, uñas y cuernos. Las otras citoqueratinas de tipo I y II (blandas) son abundantes en el citoplasma de las células epiteliales, expresándose citoqueratinas diferentes en los distintos tipos celulares diferenciados (Cooper, 2002). Las citoqueratinas se expresan en células epiteliales y carcinomas (Elias, 1990).
- **Tipo III:** incluye a la *vimentina*, que se encuentra en diferentes tipos de células, incluyendo fibroblastos, células endoteliales, células del músculo liso, glóbulos blancos sanguíneos (Lodish *et al.*, 2001; Cooper, 2002). La vimentina la encontramos en células de origen mesodermal, neuroectodermal y en sarcomas no miogénicos (Elias, 1990). Otra proteína tipo III, la *desmina*, se expresa de manera específica en las células musculares, donde conecta los discos Z de los elementos contráctiles individuales (Cooper, 2002). La desmina se encuentra en muchos tipos de células musculares como sarcomas

miogénicos, rabdomiosarcomas, leiomiosarcomas (Elias, 1990). En este grupo también se ubican la *proteína ácida fibrilar glial (GFAP)*, que se encuentra en los astrocitos y células gliales. Por último, la *periferina*, que se encuentra en las neuronas del sistema nervioso central y periférico (Lodish *et al.*, 2001).

- **Tipo IV:** incluyen a las tres *proteínas de neurofilamentos (NF)* (NF-L, NF-M y NF-H) que se encuentran en las neuronas maduras, abundan principalmente en los axones de las neuronas motoras y se piensa que desempeñan un papel crítico en el sostén de estas prolongaciones (Cooper, 2002). Los neurofilamentos también se encuentran en neuronas centrales y periféricas, tumores neuronales y células endocrinas (Elias, 1990).
- **Tipo V:** son las *láminas nucleares* que se encuentran en la mayoría de células eucariotas, estas láminas son componentes de la envoltura nuclear (Cooper, 2002). Es una reciente adición a la familia de IFP. Son subunidades de la malla de membrana nuclear de una variedad de células, actualmente no son importantes porque no tienen significancia en su función y recién están siendo investigadas (Elias, 1990).
- **Tipo VI:** la única proteína (*nestina*) que se expresa en la etapa anterior del desarrollo de las neuronas y en las células madre del sistema nervioso central (Cooper, 2002).

La expresión de las IFP parece ser controlada por genes individuales y muestra una regulación cuidadosa del patrón de la diferenciación celular. Se piensa que las IFP son responsables de la forma celular, organización interna y movimiento celular, pero su función actual no está determinada. Pero lo importante para los patólogos es que las IFP (particularmente las citoqueratinas) son excelentes marcadores de la diferenciación celular, porque su expresión se mantiene relativamente bien durante su transformación maligna. Esta detección puede ser utilizada en la clasificación del tumor (Elias, 1990).

Las proteínas de los filamentos intermedios pueden ayudar en el diagnóstico y tratamiento de diferentes tumores. En un tumor, las células pierden su apariencia normal, por lo que no se las puede identificar por su morfología. Las células tumorales retienen muchas de las diferentes propiedades de las células de la cual han derivado, incluyendo la expresión de las proteínas de los filamentos intermedios. Utilizando anticuerpos específicos para las proteínas de los filamentos intermedios, se puede determinar el origen celular de la neoplasia; si es de origen epitelial, mesenquimal o neuronal (Lodish *et al.*, 2001).

### 2.12.1. Citoqueratinas

Las citoqueratinas (**CKs**) constituyen el sistema de filamentos intermedios, que forman parte del citoesqueleto de las células epiteliales. Comprenden una familia multigénica de proteínas relacionadas en los diferentes tipos de células epiteliales (Moll *et al.*, 1982). La diferente expresión de estas proteínas está ligada a programas de diferenciación celular específicos (Osborn y Weber, 1983).

Las **CKs** son una familia compleja de al menos 19 diferentes polipéptidos expresados en células epiteliales, en varias pero específicas combinaciones. Pueden subdividirse en Tipo 1 o Subfamilia A, de bajo peso molecular (40-56.5 kD) y relativamente ácidas (**CKs** 9 hasta 19) y Tipo 2 o Subfamilia B, de alto peso molecular (52-67 kD) y relativamente básicas (**CKs** 1 hasta 8) (Elias, 1990).

La coexpresión de la mayoría de ambos tipos de **CKs** sigue reglas bien definidas que están principalmente relacionadas con tres factores: el tipo de epitelio (simple o estratificado), el programa de diferenciación de cada tejido epitelial y el crecimiento celular (normal o hiperproliferativo) (Tseng *et al.*, 1982; Sun *et al.*, 1984).

En la formación de los filamentos de **CKs**, parece ser que se requiere la participación de dos cadenas de cada tipo de **CKs** (dos de las de tipo I y dos de las de tipo II) para formar un tetrámero heterotípico – predominante, o exclusivo-

tanto *in vivo* como *in vitro* (Sun *et al.*, 1984). Según la distribución histológica se puede considerar tres grandes grupos de **CKs**:

- Las **CKs** del epitelio simple. Se encuentran las **CKs** 7, 8, 18 y 19, estas son las únicas **CKs** presentes en el epitelio simple, pero las **CKs** 8 y 18 se pueden expresar también en ciertos tipos de glándulas y epitelios estratificados.
- Las **CKs** de los epitelios de alta complejidad celular, que incluyen los glandulares, ductales, pseudoestratificados y estratificados no queratinizados, así como el **urotelio**, en los que pueden expresar las **CKs** 4-6, 13-15 y 17.
- Las **CKs** de la diferenciación suprabasal de la epidermis que incluyen las **CKs** 1, 2, 5, 9-11 y 16, también están presentes en otros epitelios estratificados, como son el gingival, vaginal, exocervical y en la mucosa peneana (Rojas *et al.*, 1998).

La nomenclatura de los diferentes anticuerpos monoclonales que reaccionan específicamente con **CKs** es complicada, pero en general, las **CKs** tipo I se pueden identificar con el anticuerpo monoclonal grupo-específico AE1 y las **CKs** tipo II reaccionan con el anticuerpo monoclonal AE3. Lo ideal para un anticuerpo sería que reconociese a todas las **CKs** o la gran mayoría y que no tenga reacciones cruzadas con otros filamentos intermedios, esto es conocido como el anticuerpo **Anti-Pancitoqueratina**, que sería el complejo de **CKs** AE1/AE3 que reconoce a la mayoría de **CKs** tipo I y II (Rojas *et al.*, 1998).

Diferentes tipos de epitelio, como el epitelio columnar simple, pueden ser distinguidos del epitelio estratificado por el uso de anticuerpos específicos para cada citoqueratina. La mayor parte del epitelio simple expresa citoqueratina de bajo peso molecular (40-54 Kd), por otro lado las citoqueratinas expresadas en el epitelio estratificado escamoso son generalmente de alto peso molecular (48-67 Kd). El epitelio queratinizado también expresa citoqueratinas de alto peso



molecular (56.5-67 Kd), **el epitelio transicional (vejiga)** y el pseudoestratificado (pulmón) expresa una combinación de citoqueratinas de alto y bajo peso molecular. Sin embargo, las células epiteliales contienen un patrón complejo de 2 a 10 polipéptidos de citoqueratinas, lo cual hace imposible establecer un fenotipo único para una particular neoplasia epitelial (Elias, 1990).

Entonces, distinguir una neoplasia de células epiteliales de otras, como los adenocarcinomas, carcinoides y mesoteliomas, puede ser difícil. Sin embargo, la expresión constante de citoqueratinas particulares en el epitelio y sus tumores correspondientes pueden permitir su categorización por perfiles de citoqueratinas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CK18 reconocen el epitelio glandular y no el epitelio escamoso, estos anticuerpos pueden ser utilizados para distinguir adenocarcinomas de carcinomas de células escamosas; siendo los adenocarcinomas positivos al anticuerpo y los carcinomas de células escamosas negativos (no reactivo). Algunos adenocarcinomas de próstata son inmunoreactivos o sólo débilmente y no uniformemente reactivos con el anticuerpo anti-CK18 a diferencia de una próstata normal e hiperplásica, en que la reacción es intensa (Elias, 1990).

La distinción entre carcinoma pulmonar de células pequeñas y otros tipos de cánceres pulmonares es de vital importancia para el manejo del paciente. Un panel de anticuerpos específicos de citoqueratina (CK4, CK7, CK8, CK10, CK13, CK18, CK19) es usado para distinguir la diferenciación de células escamosas, diferenciación de adenocarcinomas y diferenciación de cáncer pulmonar de células pequeñas, la mayoría de tipos del carcinoma pulmonar (Elias, 1990).

Normalmente, las IFP son retenidas en las células después de su transformación maligna, pero con algunas excepciones. Los adenocarcinomas y sus metástasis generalmente conservan la CK presente en la célula epitelial de la cual se originaron, pero el carcinoma de células escamosas puede presentar una citoqueratina de diferente característica del que se ve en una célula normal. El

tumor de células escamosas expresa proteínas complejas de citoqueratinas que están ausentes o en menor componente de queratinocitos normales (Elias, 1990).

Usualmente, la mayor diferenciación de **CKs** de alto peso molecular se va reduciendo en las neoplasias y este es un inicio de la expresión de CK de bajo peso molecular. La razón por la aparente activación de la producción de **CKs** de bajo peso molecular es desconocida, pero está reportado en diferentes tumores. Las citoqueratinas de bajo peso molecular no sostienen estar en relación con el estado proliferativo como el más pobremente diferenciado carcinoma escamoso. Presumiblemente el tipo más proliferativo tiende a tener que reducir la producción de CK de bajo peso molecular comparado con los tumores mejor diferenciados (Elias, 1990).

El diagnóstico diferencial es más fácil para células epiteliales que contienen sólo de 2 a 3 **CKs** diferentes. Hepatocitos normales contienen sólo la CK8 y CK18. El carcinoma hepatocelular, puede no seguir las reglas de expresión de la CK y marcarse con el anticuerpo AE1, que no es un marcador en hepatocitos normales. El anticuerpo monoclonal CK10 que reacciona sólo con células queratinizadas facilita la detección del carcinoma de células escamosas. El anticuerpo monoclonal CK7 reacciona sólo con secciones de tejido congelado, descubre sólo una sub-población de adenocarcinomas, no reaccionando con tipos de adenocarcinomas severos del sistema gastrointestinal o urinario. Sin embargo, el uso de sólo anticuerpos anti-citoqueratinas puede guiarnos a un diagnóstico incorrecto de un carcinoma. Por ejemplo, porque el CK19 y posiblemente el CK8 está expresado en el músculo liso, es recomendado el uso de anticuerpos anti-músculo como la desmina (Elias, 1990).

### **2.12.2. Vimentina**

Es una proteína citoplasmática (52 kD), se le conoce como vimentina, decamina o filamento intermedio del fibroblasto. Es la de mayor importancia por ser la más evolutivamente conservada de las IFP y la primera IFP expresada

durante el desarrollo embrionario del tipo celular. Durante este desarrollo, la vimentina es reemplazada por los filamentos intermedios específicos para cada línea celular, pero es retenida en las células mesenquimales (células endoteliales, células fibroblásticas, macrófagos, células de Sertoli, melanocitos, linfocitos, células granulosa del ovario). Por lo tanto, no sorprende que la vimentina sea la única clase de IFP que no está estrictamente limitada a un tipo celular (Elias, 1990).

Se demostró la distribución de vimentina en muchas células mesenquimales normales como fibroblastos, células del músculo liso, lipocitos, células nerviosas periféricas (Schwann), células endoteliales vasculares, macrófagos (incluyendo las células de Kupffer), como también las células mioepiteliales de las glándulas sudoríparas, salivales y mamarias (Asumi y Battifora, 1987).

El uso del anticuerpo anti-vimentina, es el marcador clave en el diagnóstico de rhabdomyosarcomas, tumores del tejido blando no muscular como: fibrosarcomas, liposarcomas, angiosarcomas, condrosarcomas e histiocitomas fibrosos malignos; seminomas, schwannomas y tumores óseos. También se expresa en linfoma, leucemia y melanoma (Elias, 1990).

En tejidos anormales se demostró estar presente en muchos melanomas, meningiomas, schwannomas y sarcomas. La positividad variable (10-57%) ha sido reportada en algunos mesoteliomas, linfomas de células grandes y adenomas pleomórficos, adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas, carcinomas indiferenciados de células pequeñas, carcinoides, paragangliomas, timomas y neuroblastomas, especialmente cuando el tejido ha sido fijado en formalina en lugar de etanol. La coexpresión de vimentina con queratina se encontró relativamente común en carcinomas indiferenciados, algunos neoplasmas epiteliales, como también en sarcomas epitelioides y sinoviales (Asumi y Battifora, 1987).

### **2.13. Peroxidasa de rábano picante**

Los métodos de coloración inmunoenzimáticos utilizan reacciones de enzima-sustrato para convertir a los cromógenos sin color en productos finales coloreados. Las enzimas son proteínas catalizadoras, se puede clasificar como enzimas hidrolíticas (estereasas, proteasas), fosforilasas, enzimas oxidoreductivas (dehidrogenasas, oxidasas, peroxidasas), enzimas de transferencia, entre otras. La actividad enzimática depende de diversas variables, tales como concentraciones de enzima y sustrato, pH, concentración de sal en buffer, temperatura y luz. Muchas enzimas también poseen porciones químicas no-proteináceas llamadas grupos prostéticos. En la peroxidasa el grupo prostético es la hierro-protoporfirina (Boenisch, 2002).

La peroxidasa de rábano picante (HRP), de peso molecular 40 kD, es aislada de la raíz de la planta de rábano. La HRP tiene un grupo con contenido de hierro (hematina) como su sitio activo y en solución su color es marrón. La hematina de la HRP primero forma un complejo con el peróxido de hidrógeno y luego causa que se descomponga resultando en agua y oxígeno atómico. HRP oxida varias sustancias, dos de las cuales son polifenoles y nitratos. Como otras enzimas, HRP y otras actividades de tipo-HRP pueden ser inhibidas por exceso de sustrato. El complejo que se forma entre la HRP y el exceso de peróxido de hidrógeno es catalíticamente inactivo y en la ausencia de un donante de electrones (por ejemplo, la sustancia cromógena) es inhibido en forma reversible (Boenisch, 2002).

El exceso de peróxido de hidrógeno y la ausencia de un donante de electrones causa el bloqueo de la actividad endógena de la HRP, que puede adherirse a otras proteínas ya sea de forma covalente o no-covalente. La unión covalente de la HRP a otras proteínas puede hacerse usando procedimientos de un paso o de dos pasos que involucran al glutaraldehído. En el procedimiento de dos pasos, la HRP reacciona primero con los reactivos bifuncionales, luego se mezcla con el anticuerpo resultando en un marcaje mucho más eficiente y sin polimerización. La

HRP también se conjuga a la estreptavidina usando el procedimiento de dos pasos de glutaraldehído. Esta forma se usa, por ejemplo, en el procedimiento Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (LSAB). La conjugación con biotina también involucra dos pasos, dado que la biotina debe ser primero derivada al éter biotinil-N-hidroxisuccinimida o a hidrazida de biotina antes que pueda reaccionar con los grupos epsilon-amino de la enzima. (Boenisch, 2002).

#### **2.14. 3,3'-diaminobenzidina (DAB)**

Es un cromógeno donante de electrones que provee la fuerza “de impulso” en la continua catálisis del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), mientras que en su ausencia detiene efectivamente la reacción. Los donantes de electrones cuando son oxidados se convierten en productos coloreados por eso se les conoce como “cromógenos”. El DAB produce un producto final de color marrón que es altamente insoluble en alcohol y otros solventes orgánicos. La oxidación del DAB también causa polimerización, que resulta en la habilidad para reaccionar con el tetróxido de osmio, aumentando su intensidad de coloración y densidad electrónica (Boenisch, 2002).

El DAB es específico para la peroxidasa, es el cromógeno más utilizado porque es barato y fácil de utilizar y origina un precipitado color marrón, visible en el microscopio óptico y muy estable. Ha demostrado efectos carcinogénicos en animales de laboratorio y se considera potencialmente peligroso para el ser humano, por lo que debe manejarse con mucho cuidado (Gimeno *et al.*, 2002).

#### **2.15. Avidina-Estreptavidina y biotina**

La mayoría de los métodos de IHQ actualmente utilizados se basan en la alta afinidad que la estreptavidina (*Streptomyces avidinii*) y la avidina (clara del huevo) tienen con la biotina. (Elias, 1990; Boenisch, 2002). La biotina es una vitamina de

bajo peso molecular encontrada en la yema de huevo (Elias, 1990). La estreptavidina y avidina poseen 4 sitios de unión para la biotina, pero a causa de la orientación molecular de los sitios de unión, menos de 4 moléculas de biotina se unirán realmente (Boenisch, 2002).

Debido a que la avidina es una glicoproteína y tiene un punto isoelectrónico (pI) de 10, tiene una propensión para la unión inespecífica a componentes de tejido de tipo lectina y componentes de tejido cargados negativamente a pH fisiológico. Actualmente, se ha reemplazado la avidina por la estreptavidina (Boenisch, 2002), debido a que esta última muestra menos tendencia a unirse a elementos celulares (Gimeno *et al.*, 2002).

## **2.16. Métodos inmunohistoquímicos utilizando la técnica de inmunoperoxidasa**

### **2.16.1. Método directo**

En esta técnica, la más antigua, un anticuerpo primario marcado con enzima reacciona con el antígeno en el tejido. El uso subsiguiente de un substrato cromógeno concluye la secuencia de la reacción. Debido a que en este método se utilizaba sólo un anticuerpo, podía completarse rápidamente y las reacciones inespecíficas estaban limitadas. Sin embargo, dado que la coloración involucra sólo un anticuerpo marcado, se logra una escasa amplificación de señal y el método ya no es suficientemente sensible para las exigencias de hoy (Boenisch, 2002). La sensibilidad es aproximadamente equivalente a la inmunofluorescencia (Gimeno *et al.*, 2002).

### **2.16.2. Método indirecto de dos pasos**

En este caso, un anticuerpo primario sin conjugar se une primero al antígeno. Luego se aplica un anticuerpo secundario marcado con enzima dirigido contra el

anticuerpo primario (ahora antígeno), seguido por la solución del sustrato cromógeno. Si el anticuerpo primario se hace en conejo o ratón, el anticuerpo secundario debe dirigirse contra las inmunoglobulinas del conejo o del ratón, respectivamente. Este procedimiento es más sensible que el método directo dado que es probable que varios anticuerpos secundarios reaccionen con varios epítopos diferentes del anticuerpo primario, amplificando así la señal, ya que más moléculas de la enzima se depositan en cada sitio de reacción (Boenisch, 2002).

### **2.16.3. Método indirecto de tres pasos**

En este caso un segundo anticuerpo marcado con enzima se agrega a la técnica anterior. Los dos anticuerpos marcados con enzima se aplican secuencialmente. Añadir una tercera capa de anticuerpo sirve para amplificar aún más la señal, dado que más anticuerpos son capaces de combinarse al reactivo secundario previamente unido. Este procedimiento es particularmente útil para la coloración de antígenos con un número limitado de epítopos (Boenisch, 2002).

### **2.16.4. Método de la Peroxidasa-Antiperoxidasa (PAP)**

En esta técnica se utiliza un complejo inmune soluble enzima-anti-enzima, preformado. La secuencia de coloración de esta técnica consiste en el uso de un anticuerpo primario sin marcar, un anticuerpo secundario, el complejo soluble enzima-anti-enzima y la solución del sustrato. El anticuerpo primario y el anticuerpo del complejo inmune de la enzima deben ser de la misma especie. El anticuerpo secundario debe dirigirse contra las inmunoglobulinas de las especies que producen el anticuerpo primario y el complejo inmune de la enzima. El anticuerpo secundario se agrega en exceso para que uno de sus dos sitios Fab se una al anticuerpo primario, lo que deja el otro sitio disponible para unirse al anticuerpo del complejo inmune de la enzima. El método PAP utiliza el complejo peroxidasa-anti-peroxidasa, que consiste en tres moléculas de peroxidasa y dos anticuerpos. Este método es más sensible que los anteriores descritos, pero su uso actualmente es infrecuente (Boenisch, 2002).

### **2.16.5. Métodos que utilizan la interacción Avidina-Biotina**

Estos métodos presentan algunos inconvenientes como son la aparición de falsos positivos por la biotina endógena, principalmente en tejidos no fijados con formol (Pardo *et al.*, 1998). Estos métodos se basan en la afinidad extraordinariamente alta que existe entre la avidina (o estreptavidina) y la biotina, por lo que permiten una mayor reacción entre el antígeno y el anticuerpo (Gown y Bacchi, 1992).

#### **a. Método de la Avidina-Biotina**

La biotina está unida a un anticuerpo específico, por lo que se la utiliza como un puente entre un anticuerpo primario y la avidina conjugada a cualquier otro tipo de molécula reportera (Elias, 1990).

#### **b. Método del Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC)**

La secuencia básica de aplicación del reactivo consiste en anticuerpo primario, anticuerpo secundario biotinilizado, seguido del complejo preformado enzima-avidina-biotina (ABC), concluyendo con la solución del substrato. La peroxidasa de rábano picante y las fosfatasas alcalinas son las enzimas generalmente usadas (Boenisch, 2002).

#### **c. Método de la Estreptavidina-Biotina marcada (LSAB)**

Los reactivos se aplican en la siguiente secuencia: anticuerpo primario de conejo (ratón), anticuerpo secundario anti-conejo (anti-ratón) biotinilizado y conjugado con estreptavidina-peroxidasa. La reacción coloreada se revela con el substrato cromógeno apropiado (Boenisch, 2002).



#### **2.16.6. Método del polímero de dextrano marcado y conjugado con anticuerpos secundarios**

Se utiliza una molécula inerte de dextrán marcada con una enzima insertada como “columna vertebral” (Boenisch, 2002). El dextrano es un polímero de alto peso molecular, al que se conjugan covalentemente un gran número de moléculas de enzima (por ejemplo HRP, hasta 100 moléculas por cadena) y de anticuerpo secundario (hasta 20 moléculas por cadena) (Pardo *et al.*, 1998). Estos sistemas evitan el uso de estreptavidina y biotina, se evita la coloración inespecífica que resulta de la biotina endógena. La ventaja principal es la reducción en el número de pasos de incubación requeridos usualmente en el protocolo de coloración (Boenisch, 2002). Esta técnica teóricamente aumenta mucho la sensibilidad del método, permite realizar la tinción en un paso menos que las técnicas tradicionales de avidina-biotina y confiere una gran rapidez y simplicidad al método (Pardo *et al.*, 1998).

En un estudio que se realizó en 47 anticuerpos estudiados comparando la técnica de polímero de Dextrano (PDE) versus la técnica de estreptavidina-biotina peroxidasa, el 51% se tiñeron más intensamente con la técnica PDE, el 47% fue similar en ambas técnicas y un 2% resultó más intenso con la estreptavidina-biotina. Por lo tanto, se demuestra que esta técnica es más sensible y produce menos coloración de fondo que los métodos de avidina-biotina, incluso en concentraciones sub-óptimas, también por la desaparición de falsos positivos por la biotina endógena (Pardo *et al.*, 1998).

### **2.17. Esquema de un proceso inmunohistoquímico**

#### **2.17.1. Preservación de antígenos**

Una parte esencial de las técnicas histológicas y citológicas es la preservación de células y tejidos de manera reproducible y lo más parecido al estado vivo como

sea posible. Para lograr esto, los bloques de tejido o cortes se sumergen usualmente en un fijador. Los fijadores empleados previenen la autólisis por la inactivación de enzimas lisosomales e inhiben el crecimiento de bacterias y hongos, que darían lugar a cambios putrefactivos. También estabilizan las células y tejidos para protegerlos de los rigores del procesamiento. En su papel protector, los fijadores desnaturalizan las proteínas por coagulación formando compuestos aditivos. Así, los cambios conformacionales en la estructura de las proteínas causan la inactivación de las enzimas. Los complejos resultantes difieren de las proteínas sin desnaturalizar, tanto en los perfiles químico como antigénico (Boenisch, 2002).

Además de alterar la naturaleza química de las células y tejidos a los que se aplican, los fijadores causan también cambios físicos en los constituyentes celulares y extracelulares. La fijación rompe la impermeabilidad de la membrana celular y permite que moléculas relativamente grandes penetren y escapen (Boenisch, 2002).

Los fijadores más populares contienen formalina (40% peso/volumen de formaldehído en agua), una sal neutra para mantener la osmolaridad y a menudo un sistema buffer para mantener el pH. El formaldehído no fija por coagulación, sino reaccionando principalmente con aminoácidos básicos para formar “uniones cruzadas de puentes de metileno”. Esto significa que hay permeabilidad relativamente baja para las macromoléculas y que no se alteran significativamente las estructuras de las proteínas intracitoplasmáticas. Pequeños bloques del tejido fijados rápidamente en formalina neutra bufferada durante 6 a 24 horas, generalmente mostrarán una buena preservación citológica o inmunolocalización, con un mínimo de enmascaramiento del antígeno. Las grandes variaciones en los tiempos y las condiciones para la fijación son la causa de la mayoría de problemas en inmunohistoquímica (Boenisch, 2002).

La formalina bufferada neutra (NBF) no es una fijación inocua para la IHQ, porque ésta reacciona con las proteínas, además disminuye o elimina

completamente la inmunoreactividad de muchos antígenos tisulares por la formación de enlaces cruzados entre grupos terminales de proteínas. El resultante intermolecular e intramolecular de los enlaces cruzados altera la estructura primaria y terciaria de los antígenos. Idealmente la fijación en NFB debería ser en un rango de 12 a 24 horas. (Elias, 1990).

Aunque algunos antígenos no se preservan bien después de la fijación en fijadores a base de formaldehído, muchos pueden demostrarse después del uso de métodos de pre-tratamiento apropiados, como la digestión con enzima proteolítica y/o recuperación antigénica (Boenisch, 2002).

Los anticuerpos monoclonales se seleccionan por su habilidad de unirse específicamente a un epítipo del inmunógeno. Si el formaldehído reacciona con los aminoácidos dentro del epítipo, el anticuerpo será incapaz de unirse y por consiguiente será inútil para marcar el tejido fijado con formaldehído (Boenisch, 2002).

Si hay cambios conformacionales que resulten de la reacción del formaldehído con los aminoácidos adyacentes al epítipo, estos pueden revertirse a menudo usando la digestión con enzimas proteolíticas o por medio de la recuperación antigénica. Si hay cambios conformacionales en el epítipo debido al procesamiento del tejido, éstos son irreversibles (Boenisch, 2002).

La fijación con NBF diferencialmente compromete la inmunoreactividad de antígenos de membrana, citoqueratinas, vimentina, fibronectina e inmunoglobulinas (Elias, 1990). Por lo tanto, los fijadores que forman compuestos aditivos pueden bloquear la inmunoreactividad, pero con la selección apropiada de anticuerpos monoclonales y el tratamiento post-fijación apropiado, el formaldehído es conveniente para muchos anticuerpos monoclonales (Boenisch, 2002).

Muchos epítopos son sensibles al calor y durante el paso de inclusión, se calientan los tejidos al punto de la fusión de la parafina, normalmente entre 50-

60°C. Los estudios han demostrado que los epítomos de vimentina que reaccionan con algunos anticuerpos monoclonales tienen una vida media de 10 a 15 minutos a 60°C. Así, sobrecalentar los tejidos durante la inclusión o los cortes durante el secado puede inducir efectos perjudiciales en la inmunocoloración. Es esencial no sobrecalentar en cualquiera de las fases del proceso si se desea una inmunocoloración óptimamente sensible (Boenisch, 2002).

### **2.17.2. Recuperación antigénica-desenmascaramiento de antígenos**

Debido a la mejor preservación de la morfología, el tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFPE) es el más utilizado en nuestro medio. Sin embargo, la pérdida de inmunoreactividad por parte de muchos antígenos como resultado de la fijación con formalina, se ha convertido en un desafío (Boenisch, 2002).

La falta de uniformidad en el uso de formalina entre los laboratorios, ha contribuido a esta complejidad, ya que los factores de concentración, pH y tiempo influyen notablemente en el resultado de la coloración en inmunohistoquímica. Además, los cambios fisiológicos y patológicos en la composición del tejido, incluyendo la yuxtaposición de proteínas del tejido y sus sitios antigénicos (epítomos), no permite predecir el resultado de la fijación con algún grado de certeza. Cada antígeno puede contener de uno a muchos epítomos y cada uno de éstos puede estar compuesto de cinco a más aminoácidos. Aunque la fijación con formalina permitirá que algunos epítomos permanezcan inalterados (resistentes a la formalina), otros sufrirán cambios sustanciales (sensibles a la formalina). En este proceso, también es posible la unión cruzada de proteínas no relacionadas al antígeno blanco. El resultado final es la pérdida parcial o completa de la inmunoreactividad por el antígeno y/o el “enmascaramiento” del mismo (Boenisch, 2002).

El primer intento para mejorar la inmunoreactividad de los tejidos fijados en formalina fue el uso de la digestión con tripsina previo a la coloración por inmunofluorescencia. La digestión proteolítica compensa la naturaleza

impermeable de los fijadores no coagulantes actuando como mordiente sobre el tejido y permitiendo exponer los determinantes ocultos. Sin embargo, el uso de enzimas puede traer consigo el riesgo de destruir algunos epítomos (Boenisch, 2002).

Un enfoque completamente nuevo para la restauración de la inmunoreactividad en cortes de tejido FFPE es el uso de soluciones conteniendo varios metales y el calentamiento en un horno de microondas para lograr la restauración. El término de “**Recuperación Antigénica**” se aplicó por primera vez (Boenisch, 2002).

El concepto de recuperar la inmunoreactividad perdida, por medio de la exposición al calor cerca del punto de ebullición del agua fue visto al principio con escepticismo, ya que iba contra el principio de proteger a las proteínas del efecto desnaturizador del calor. Sin embargo, otro avance importante en el uso del calor es cuando en un estudio se utilizó un buffer de citrato a pH 6.0 en lugar de la solución de metal original, realizando la primera demostración exitosa en tejido FFPE del marcador de proliferación Ki-67. Poco después, se aplicaron estas modificaciones en los métodos de recuperación antigénica a una amplia variedad de marcadores adicionales. No solo mejoró la coloración de muchos marcadores de tejido, sino que más importante aún, una cantidad de antígenos, previamente considerados como no reactivos en tejidos FFPE, pudieron demostrarse con éxito por primera vez. Esto incluyó marcadores de proliferación adicionales, receptores de hormona, entre otros (Boenisch, 2002).

El principio de recuperación antigénica depende de la aplicación de calor, por tiempos variables, a los cortes de tejido FFPE en un medio acuoso. Después de desparafinar y rehidratar los cortes de tejido, las láminas normalmente se sumergen en una solución acuosa llamada “solución de recuperación”. Las recientes comparaciones sistemáticas de varias soluciones de recuperación demostraron que el TRIS-HCL 0.01 M, pH 1 o 10, era ligeramente superior al buffer citrato a pH 6.0 y dio el mejor resultado global (Boenisch, 2002).

Luego de la inmersión en la solución de recuperación precalentada, los recipientes que contienen las láminas se exponen al calor. Este paso es el más crítico y el grado al que puede restaurarse la inmunoreactividad se relaciona directamente con la duración de la incubación y la temperatura alcanzada. Los métodos de calentamiento normalmente utilizados incluyen el uso de hornos microondas, autoclaves, vaporeras, ollas a presión y baño maría. Sin embargo, sus ventajas y desventajas están sujetas a experimentación continua. Aunque la temperatura óptima no se ha establecido, la mayoría de los métodos de Recuperación Antigénica aplican temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua. La duración óptima de la exposición para calentar puede variar de 10 a 60 minutos y puede depender en alguna medida de la duración de la fijación en formalina. La incubación de 20 minutos parece ser la más satisfactoria para la mayoría de antígenos y protocolos de fijación. El enfriado posterior es realmente lento, requiriendo otros 20 a 30 minutos (Boenisch, 2002).

El mecanismo de acción de este procedimiento se mantiene hasta hoy ampliamente desconocido. El calor es obviamente de gran importancia para revertir los daños causados por la fijación con formalina y la inclusión de parafina. Cualquiera que sea el mecanismo, algunas uniones cruzadas inducidas por la formalina deben permanecer intactas ya que sin éstas las proteínas serían desnaturalizadas por el calor usado. Esta observación aparentemente contradictoria sólo puede ser explicada por el hecho que algunas uniones cruzadas son reversibles, restaurando así la integridad inmunohistoquímica de la proteína, mientras que otras uniones cruzadas no lo son (Boenisch, 2002).

### **2.17.3. Bloqueo de uniones inespecíficas**

La coloración positiva de una muestra que no resulta de la unión específica antígeno-anticuerpo es descrita como la coloración de fondo no específica. La causa más común es la unión de la proteína (anticuerpo) a los elementos del tejido conectivo y colágeno altamente cargados. Para prevenir estas uniones

inespecíficas se le adiciona una solución proteica inocua a la muestra antes o al mismo tiempo de aplicar el anticuerpo primario (Bourne, 1983).

La adición al diluyente del anticuerpo primario de albúmina de suero bovino al 1% (BSA) es probablemente el paso más ampliamente practicado para reducir las uniones inespecíficas debidas a la interacción hidrofóbica. Otros posibles métodos para reducir interacciones hidrofóbicas entre el tejido y las proteínas del reactivo incluyen el añadido de detergente (p. ej. Tween 20) o etilenglicol al diluyente, o elevando el pH del diluyente que es usado sólo para los anticuerpos policlonales (Boenisch, 2002).

#### **2.17.4. Saturación de peroxidasas endógenas**

La actividad de la peroxidasa produce la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y es una propiedad común de todas las hemoproteínas como la hemoglobina (glóbulos rojos), mioglobina (células del músculo), citocromo (granulocitos, monocitos) y catalasas (hígado y riñón). La actividad intersticial de la peroxidasa puede encontrarse debido a la difusión de sangre previa a la fijación (Boenisch, 2002).

El procedimiento normalmente usado para suprimir la actividad de la peroxidasa endógena en tejido fijado con formalina es la incubación de los cortes con 4-6 gotas de peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 a 10 minutos (Bourne, 1983). Sin embargo, en la mayoría de los trabajos con tejido fijado en formalina, la interpretación exitosa de la coloración específica no se impide por la actividad de la peroxidasa endógena (Boenisch, 2002).

#### **2.17.5. Controles**

Los controles positivos y negativos son evaluados durante el proceso de IHQ. Para los controles negativos se reemplaza el anticuerpo primario por suero normal (no-inmune) de la misma especie animal en la cual el anticuerpo primario fue

producido. Los controles positivos son de secciones de tejidos que contienen el antígeno supuesto, que han demostrado una fuerte reacción positiva (Mills, 1980).

Estos controles son necesarios para la validación de los resultados de la coloración en IHQ. El objetivo principal es determinar si los anticuerpos primarios y secundarios son específicos para sus antígenos blanco (Boenisch, 2002).

Otro tipo de control negativo es cuando se procesa de manera idéntica al desconocido, pero no contiene el antígeno buscado. El control positivo también se procesa de manera idéntica pero tiene que contener el antígeno buscado. También se puede utilizar controles de tejidos internos, conocidos con el nombre de “controles dentro de la misma estructura”. Este control es el ideal porque se eliminan las variables de fijación del tejido entre la muestra problema y control. Los controles internos contienen el antígeno blanco no sólo en los elementos del tejido bajo escrutinio (tumores), sino además en elementos del tejido normal adyacente. Además, estos controles internos tienen la ventaja adicional que no se requiere una sección extra para control positivo (Boenisch, 2002).

#### **2.17.6. Sensibilidad y especificidad**

La sensibilidad de un método IHQ puede ser medida como la menor concentración detectable del antígeno. Está representada por la menor intensidad de coloración que puede ser distinguida de la coloración de fondo (Gimeno *et al.*, 2002; Gown y Bacchi, 1992). La sensibilidad de un anticuerpo es definido como el porcentaje de “verdaderos positivos” (Gown y Bacchi, 1992).

La especificidad es la más importante de todos los criterios para validar un método IHQ. Es la habilidad de un anticuerpo para detectar un determinante antigénico (epítipo) con exclusión de otros (Gimeno *et al.*, 2002). Por lo tanto, la especificidad de un anticuerpo se debe en parte a diversas variables, como la fijación y el tipo de anticuerpo, si es monoclonal o policlonal (Gown y Bacchi, 1992).



### **2.17.7. Adhesivos**

El continuo manejo y los numerosos pasos involucrados como la digestión enzimática o la recuperación antigénica, impiden que las secciones de tejido no se adhieran a la lámina y subsecuentemente se pierdan. Varios adhesivos comerciales disponibles ayudan a prevenir la pérdida del tejido (Mills, 1980).

## **2.18. Anticuerpos comerciales utilizados**

### **2.18.1. Anti-citoqueratina**

Es una anti-queratina policlonal de conejo de amplio espectro, a partir de la queratina epidermal del hocico de bovino de las subunidades de 58, 56 y 52 kD, menos abundantes en las subunidades de 60, 61 y 48 kD.

Es un anticuerpo primario pre-diluido, listo para usar. Este anticuerpo primario está disponible en un volumen de 7 ml como antisuero de conejo en 0.05 M Tris-Hcl Buffer, pH 7.6, conteniendo proteína transportadora y 15 mM azida sódica. Se mantiene a una temperatura de 2-8 °C. Es el anticuerpo utilizado en el presente estudio.

Es utilizado por los laboratorios para identificar cualitativamente por microscopio óptico células epiteliales queratina-positivos en tejidos normales y neoplásicos utilizando el método de inmunohistoquímica. Los resultados positivos ayudan en la clasificación del origen epitelial del tejido normal y neoplásico. La coloración celular es a nivel citoplasmático (DakoCytomation, Prospecto Anti-Citoqueratina).

### **2.18.2. Anti-Vimentina**

Es una anti-vimentina monoclonal de ratón, es el clon VIM 3B4. El inmunógeno es la vimentina purificada del cristalino de bovino; Isotipo, IgG2a, *kappa*. Es un

anticuerpo primario pre-diluido, listo para usar, está disponible en un volumen de 7 ml como inmunoglobulina purificada de vimentina en 0.05 M Tris-Hcl Buffer, pH 7.6, conteniendo proteína estabilizadora y 0.015 mol/L azida sódica. Se mantiene a una temperatura de 2-8°C. Es el otro anticuerpo utilizado en este estudio.

Se utiliza para identificar cualitativamente por microscopio óptico células de origen mesenquimal en tejidos normales y neoplásicos. En las células mesenquimales, la expresión de vimentina ha sido encontrada uniformemente en el citoplasma (DakoCytomation, Prospecto Anti-Vimentina).

## **2.19. Estudios previos**

El marcado inmunoenzimático de filamentos intermedios en los tumores de la vejiga urinaria en bóvidos con HVEB es un indicador preciso de su histogénesis (Radostits *et al.*, 2002). En un estudio inmunohistoquímico sobre una muestra de la variante pagetoide del carcinoma urotelial *in situ* (CIS) de la vejiga urinaria de una vaca con HVEB que consumía *P. aquilinum*, al que se corroboró su asociación al papilomavirus tipo 2 (BPV-2) de los bovinos, se utilizaron los anticuerpos comerciales policlonales del conejo, la citoqueratina (clone MNF 116, Dako, Dinamarca), la vimentina (copia V9, Dako, Dinamarca) y la proteína S-100 (Biomeda, E.E.U.U.). Inmunohistoquímicamente, todas las células neoplásicas fueron negativas para la vimentina y la proteína S-100 pero positivas para las citoqueratinas (Borzacchiello *et al.*, 2001).

En el mismo estudio, se detectó mediante la IHQ la expresión de la proteína frágil de la tríada de la histidina (FHIT) usando un antisuero primario policlonal del conejo anti-Glutatión S-Transferasa-FHIT. Las células normales y neoplásicas expresaron la proteína FHIT; asombrosamente, algunas células pagetoides no, por lo que estas células se consideran como células neoplásicas más indiferenciadas, y este fenotipo puede ser típico de las células agresivas (Borzacchiello *et al.*, 2001). Se ha sugerido que las células neoplásicas son más indiferenciadas,

cuanto mayor es la reducción y/o la pérdida de la expresión de la proteína FHIT (Sozzi *et al.*, 1998). Además, el fenotipo de las células neoplásicas que no expresan la proteína de FHIT puede caracterizar el patrón morfológico de los tumores, el comportamiento biológico de los cuales demuestra una agresividad notable (Tomizawa *et al.*, 1998).

Se realizó un estudio inmunohistoquímico en neoplasias de felinos, por el cual caracterizaron los anticuerpos de las proteínas de los filamentos intermedios para que se puedan incluir en los paneles de diagnósticos tumorales en felinos, utilizando para ello 28 neoplasias epiteliales y 22 no epiteliales; entre las neoplasias epiteliales tenemos: carcinomas de células escamosas, carcinomas de la célula basal, carcinomas de la glándula sebácea, carcinomas de la glándula apocrina, carcinomas papilares de la tiroides, carcinomas sólidos de la tiroides, carcinomas de la célula renal, carcinomas papilares renales, carcinomas endometriales, y carcinomas bronquio-alveolares del pulmón. Entre las neoplasias no epiteliales tenemos: fibrosarcoma, liposarcoma, leiomiosarcoma, rhabdomiosarcoma, hemangiosarcoma, mastocitoma, osteosarcoma, melanoma, y linfoma. A través de la Técnica Avidina-Biotina-Peroxidasa, las muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina, se sometieron a los anticuerpos comerciales dirigidos contra las citoqueratinas de alto y bajo peso molecular, vimentina, desmina, proteína ácida fibrilar glial y neurofilamentos. Resaltando que todos los tumores epiteliales excepto el carcinoma endometrial expresaron un cierto tipo de citoqueratinas; las neoplasias no epiteliales que expresaron exclusivamente a la vimentina fueron: fibrosarcomas, liposarcoma, hemangiosarcoma, mastocitomas, osteosarcomas y melanomas; y las que expresaron a la vimentina y desmina fueron: leiomiosarcoma, rhabdomiosarcoma y un fibrosarcoma (Martín de las Mulas *et al.*, 1995).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Lugar de estudio**

El procesamiento inmunohistoquímico se desarrolló en el Laboratorio de Histopatología del Hospital General María Auxiliadora, ubicado en el distrito de San Juan de Miraflores - Lima. La lectura e interpretación de las láminas procesadas con la técnica de inmunohistoquímica se realizaron en el Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.

#### **3.2. Características de las muestras**

Para el presente estudio se utilizaron las muestras incluidas en parafina del estudio anterior (Gonzáles, 2003) de casos de neoplasias histológicamente confirmadas, sugerentes de ser HVEB. Se debe de resaltar que estas muestras estuvieron fijadas en formol al 10% por un tiempo prolongado, aproximadamente entre 3-5 meses, para luego ser incluidas en parafina.

El control positivo utilizado fue un tejido de apéndice humano de apariencia histológica normal tanto para el tejido epitelial como para el vascular, fijado en formol al 10% (aproximadamente 48 horas) e incluido en parafina.

### **3.3. Tamaño de las muestras**

De un total de 28 muestras de bovinos con HVEB que se diagnosticaron con procesos neoplásicos, los más resaltantes fueron: Carcinoma *in situ*, papilomas mucosos, carcinomas transicionales, hemangiosarcomas y hemangiomas.

Del total de 28 muestras histológicamente diagnosticadas como procesos neoplásicos, se escogieron 14 muestras de mayor importancia diagnóstica, de diferentes hojas blastodérmicas y de diferentes grados de diferenciación (bien y poco diferenciadas).

Las muestras procesadas fueron diagnosticadas histopatológicamente como: 1/14 Papiloma, 4/14 Carcinomas y 9/14 que presentan en el mismo tejido carcinoma y hemangiosarcoma, describiéndose además en 2 hemangiosarcomas la presencia de los llamados “Nidos Angioblásticos”, reportados en el estudio mencionado, no teniéndose muy en claro el origen celular. Aparentemente son células endoteliales focalmente agrupadas con características de malignidad (Cuadro 1).

De las 14 muestras, según el diagnóstico histopatológico del estudio anterior, 5 de ellas son tumores epiteliales (papiloma y carcinomas) y las restantes tienen procesos tumorales mixtos, tanto epitelial (carcinomas) como mesenquimales (hemangiosarcoma).

### **3.4. Materiales**

- Agua corriente
- Agua destilada
- Agua Oxigenada de 120 volúmenes
- Alcohol absoluto y corriente

- Anticuerpo Primario: Cytokeratin, amplio espectro, anticuerpo rabbit anti-cow, frasco 7 ml listo para usar (DakoCytomation USA)
- Anticuerpo Primario: Vimentin, Clona Vim 3B4, anticuerpo mouse anti-cow, frasco 7 ml listo para usar (DakoCytomation USA)
- Bálsamo
- Bloques de parafina con las muestras problemas del estudio anterior a evaluar.
- Buffer Citrato, pH 6.0
- Buffer Fosfato
- Cámara Digital Sony
- Coplin de Plástico
- Equipo de Baño María
- Estufa
- Hematoxilina
- HistoGrip (Zymed)
- Horno microondas
- Kit de Inmunohistoquímica (Zymed): anticuerpo secundario biotinilizado, estreptavidina-peroxidasa, DAB.
- Láminas portaobjetos
- Láminas con los cortes histopatológicos de las muestras problemas procesadas con H-E del estudio anterior.
- Microscopio Óptico
- Micrótomos
- Papel higiénico
- Solución de Pinesol (12.5 ml de pinesol en 987.5 ml de agua destilada)
- Pipeta de 1 ml
- Pipeta de plástico descartable
- Porta Láminas
- Xilol

**Cuadro 1.** Neoplasias vesicales urinarias de bovinos con HVEB según su diagnóstico histopatológico y grado de diferenciación (incluyendo la presencia de Nidos Angioblásticos) (Adaptado de Gonzáles, 2003).

N° Muestra	Papiloma	Carcinoma	Hemangiosarcoma	Nidos Angioblásticos
01		+++	+++	
02		+++	+	
03		+	+	P
04	P			
05		+++	+++	
06		+	+++	
07		+++		
08		+++	+++	P
09		+	+	
10		+	+++	
11		+++		
12		+		
13		+		
14		+	+++	
TOTALES	01	06 (+++) 07 (+)	06 (+++) 03 (+)	02

+++ : Bien Diferenciado

+ : Poco Diferenciado

P : Presentes

### 3.5. Método inmunohistoquímico

#### 3.5.1. Estreptavidina-biotina marcada (LSAB)

A cada muestra problema incluida en parafina se le realizó dos cortes y se colocó en 2 láminas diferentes (preparadas con el adhesivo “HistoGrip”), para someter el primer corte al anticuerpo Anti-Citoqueratina (que va a reaccionar positivamente dando una coloración marrón a nivel del citoplasma de las células de origen epitelial) y al segundo corte al anticuerpo Anti-Vimentina (reacciona colorimétricamente de la misma manera pero en células de origen mesenquimal). El procedimiento es el siguiente (Sedano *et al.*, 2005)\*:

- Preparación de las láminas portaobjetos con Histogrip (Zymed).
- Localización de la muestra problema incluida en Parafina.

- Se cortaron la muestra problema y la muestra control con un micrótopo aproximadamente unas 4 micras de grosor, se recogieron las muestras y se colocaron en baño maría para posteriormente recogerlas con las láminas portaobjetos procesadas con Histogrip, se escribió su código, para al final llevarlas a la estufa a 70°C durante 10-15 minutos.
- Se desparafinó, sumergiendo las muestras en Xilol 01 por 5 minutos y Xilol 02 por otros cinco minutos más.
- Se rehidrató, sumergiendo las muestras de la siguiente manera: alcohol absoluto 01 y 02, cada uno por 5 minutos; alcohol corriente 01 y 02, cada uno por 5 minutos; agua corriente por 3 minutos.
- Recuperación antigénica: el tiempo óptimo de recuperación se determinó el primer día, probando 3 tiempos, de 10, 15 y 20 minutos, teniendo una mejor coloración en el de 20 minutos, trabajando con este último. Se colocaron de 4 a 5 láminas en un coplin de plástico lleno de la Solución Buffer Citrato a pH 6.0, se colocó en el horno microondas por 20 minutos, se calentó y retiró antes de que inicie la ebullición, se volvió a colocar agregando más solución, sin dejar que las láminas se sequen. Culminado el tiempo, se agregó la Solución de Pinesol (aceite de pino, alcohol isopropílico, emulsionante, amonio cuaternario sódico), también por 20 minutos más, finalmente se dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Se lavaron las láminas 3 veces con agua corriente.
- Se realizó el bloqueo de la Peroxidasa Endógena: se agregó agua oxigenada de 1 a 3 gotas, por 20 minutos.
- Se lavaron las láminas con agua destilada, luego con Buffer Fosfato, 3 veces con un intervalo de 2 minutos cada una.
- Se secaron las láminas con papel higiénico sin tocar la muestra.
- Se agregaron de una a dos gotas del Anticuerpo Primario Específico (Anti-Citoqueratina o Anti-Vimentina), se cubrió toda la muestra, se incubó a temperatura ambiente por 60 minutos.
- Se lavaron las láminas con Buffer Fosfato 3 veces por 2 minutos.



- Se secaron las láminas.
- Se agregaron de una a dos gotas del Anticuerpo Secundario biotinilizado, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente.
- Se lavaron las láminas.
- Se secaron las láminas.
- Se agregaron 1-3 gotas de la enzima conjugada (Estreptavidina + Peroxidasa) por 20 minutos.
- Se lavaron las láminas.
- Se secaron las láminas.
- Se agregó el sustrato con el cromógeno (1 ml de agua destilada, 1 gota de Sustrato buffer concentrado, 1 gota de solución cromógena (DAB) y 1 gota de Hidróxido de peroxidasa al 0.6%) por 10 minutos.
- Se lavaron las láminas.
- Coloración de contraste: se sumergieron las muestras en Hematoxilina por 1 minuto.
- Se lavaron con agua corriente por 5 minutos.
- Se sumergieron en alcohol corriente 01 y 02, 6 sumergidas cada uno; luego en alcohol absoluto 01 y 02, 5 minutos cada uno, luego Xilol 01 y 02, 5 minutos cada uno.
- Se realizó el montaje
- Se realizó la lectura al microscopio óptico

\* Este protocolo de Inmunohistoquímica es el utilizado por el Laboratorio de Histopatología del Hospital General María Auxiliadora.

## **IV. RESULTADOS**

### **4.1. Resultados inmunohistoquímicos**

Las 14 muestras reaccionaron positivamente según su estirpe celular a la prueba de inmunohistoquímica, 5 de origen epitelial y 9 de origen mixto epitelial y mesenquimal, dando una coloración marrón positiva en el citoplasma de las células neoplásicas, variando algunas en intensidad debido a los diferentes tiempos que estuvieron fijadas en formol, no teniendo el dato exacto de cada muestra, sólo un aproximado entre 3 a 5 meses.

La coloración de las reacciones de las muestras problemas son de una intensidad levemente menor que en la muestra control. Las 2 muestras que presentaron “Nidos Angioblásticos” asociados a hemangiosarcomas reaccionaron positivamente al anticuerpo Anti-Vimentina (Cuadro 2; Figuras 9 y 10).

**Cuadro 2.** Reacción Inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos Anti-Citoqueratina y Anti-Vimentina, según la Clasificación de las Neoplasias (incluye los Nidos Angioblásticos).

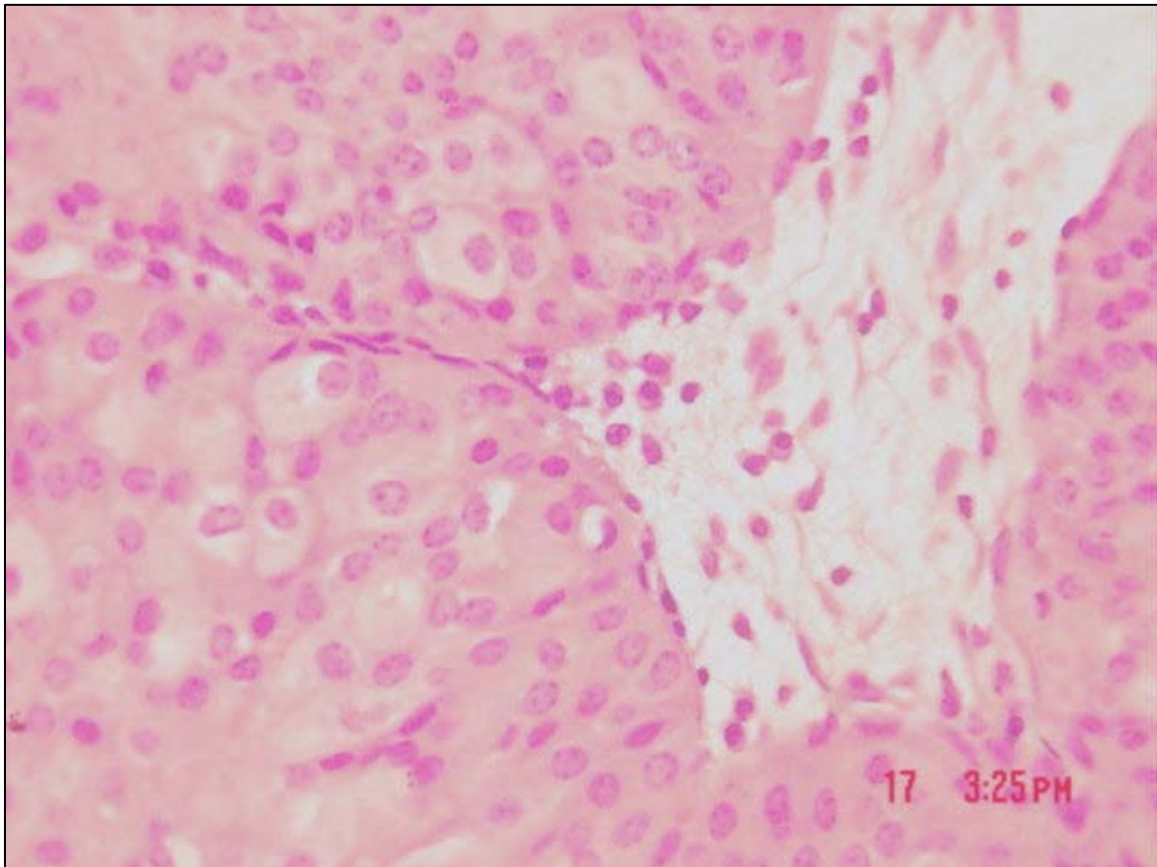
N° Muestra	Papiloma		Carcinoma		Hemangiosarcoma		Nidos Angioblásticos	
	AACK	AAVIM	AACK	AAVIM	AACK	AAVIM	AACK	AAVIM
01			+	-	-	+		
02			+	-	-	+		
03			+	-	-	+	-	+
04	+	-						
05			+	-	-	+		
06			+	-	-	+		
07			+	-				
08			+	-	-	+	-	+
09			+	-	-	+		
10			+	-	-	+		
11			+	-				
12			+	-				
13			+	-				
14			+	-	-	+		
TOTALES	01	00	13	00	00	09	00	02

**+** : Reacción positiva al anticuerpo.

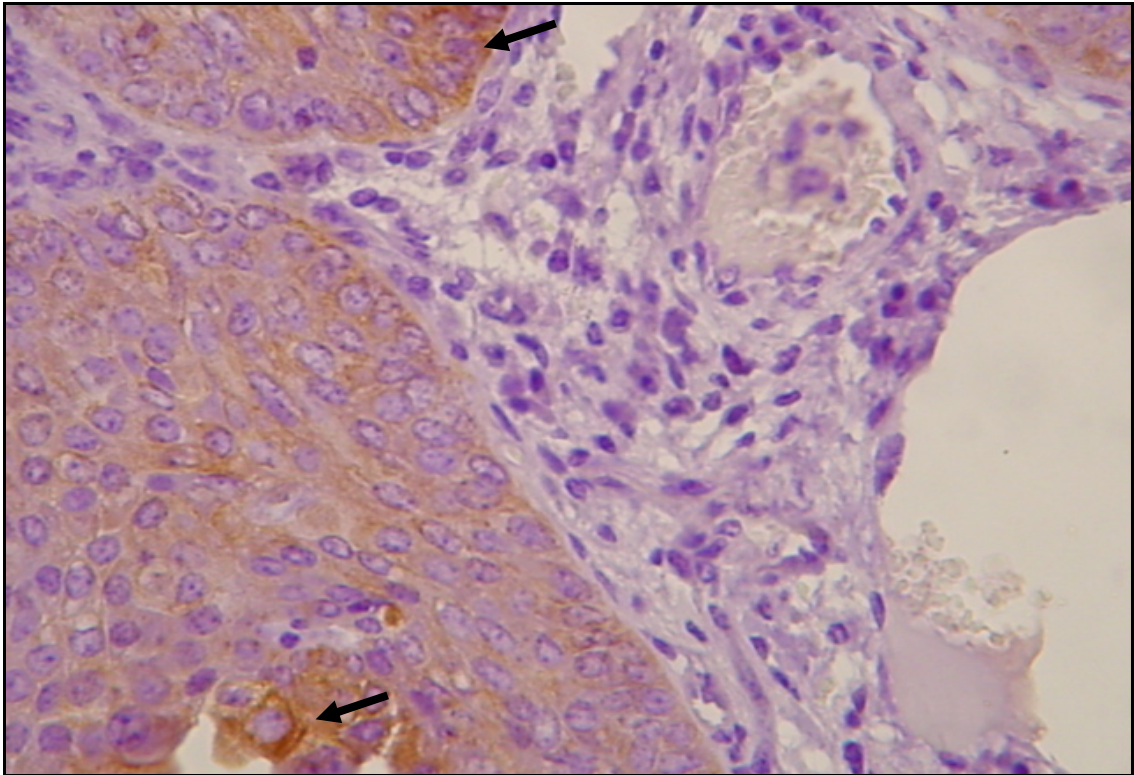
**-** : Reacción negativa al anticuerpo.

**AACK** : Anticuerpo Anti-Citoqueratina

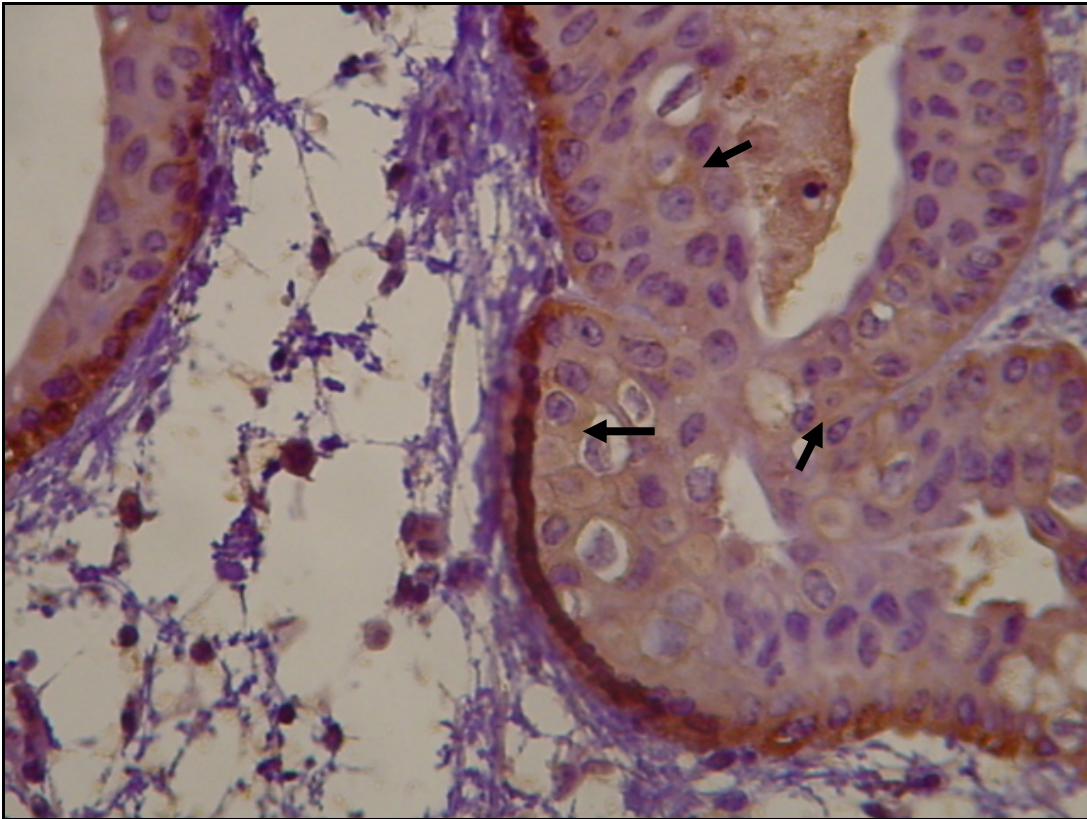
**AAVIM** : Anticuerpo Anti-Vimentina



**Figura 1. Carcinoma de células transicionales, Hematoxilina-eosina**

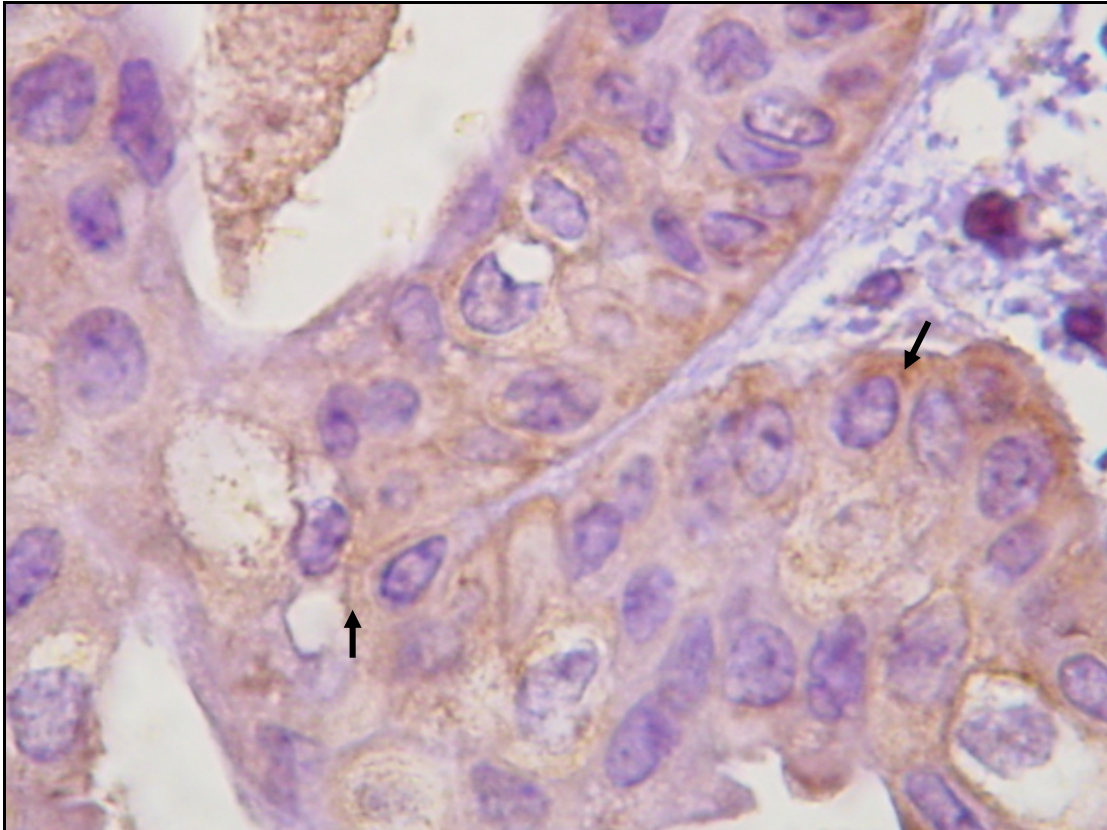


**Figura 2. Carcinoma, Anti-Citoqueratina positivo (40x). Reacción positiva al anticuerpo de color marrón en el citoplasma de células epiteliales malignas (flechas)**

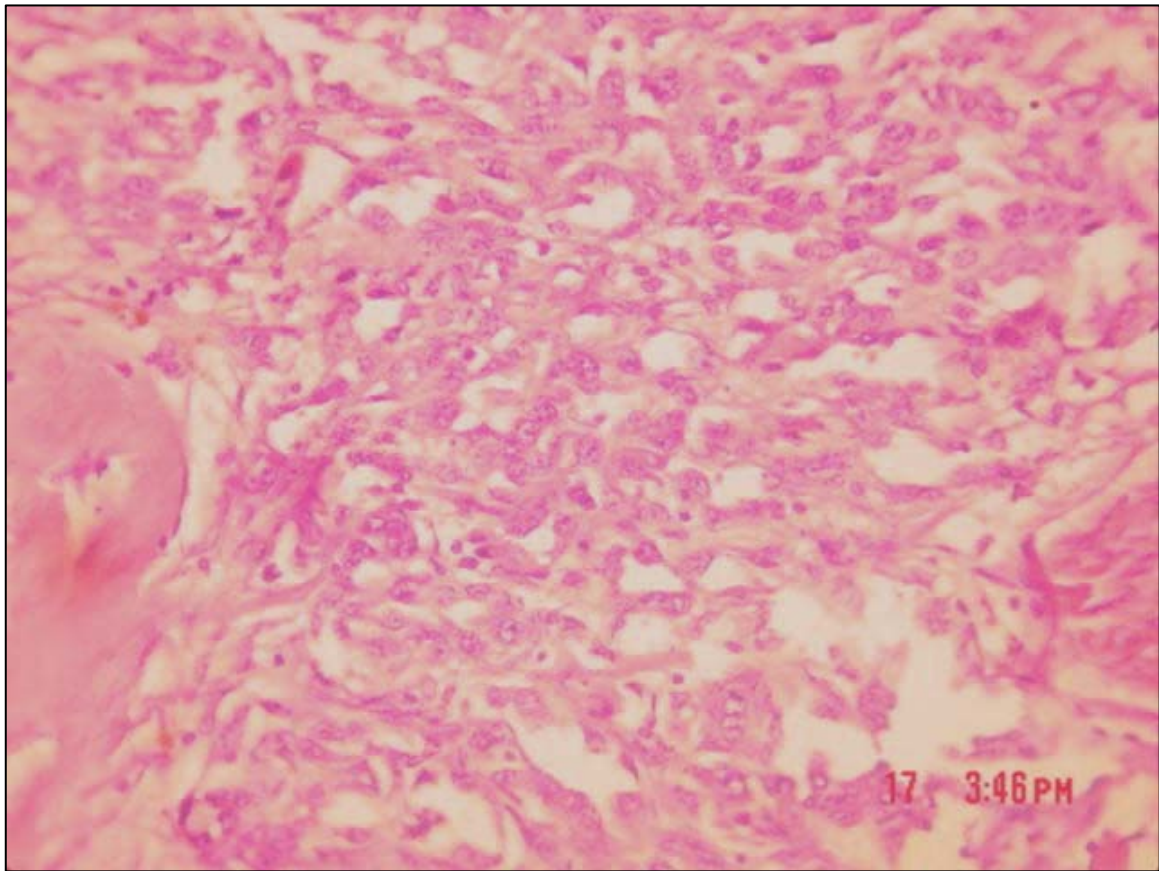


**Figura 3. Carcinoma, Anti-Citoqueratina positivo (40x). Reacción positiva al anticuerpo de color marrón en el citoplasma de células epiteliales malignas (flechas).**



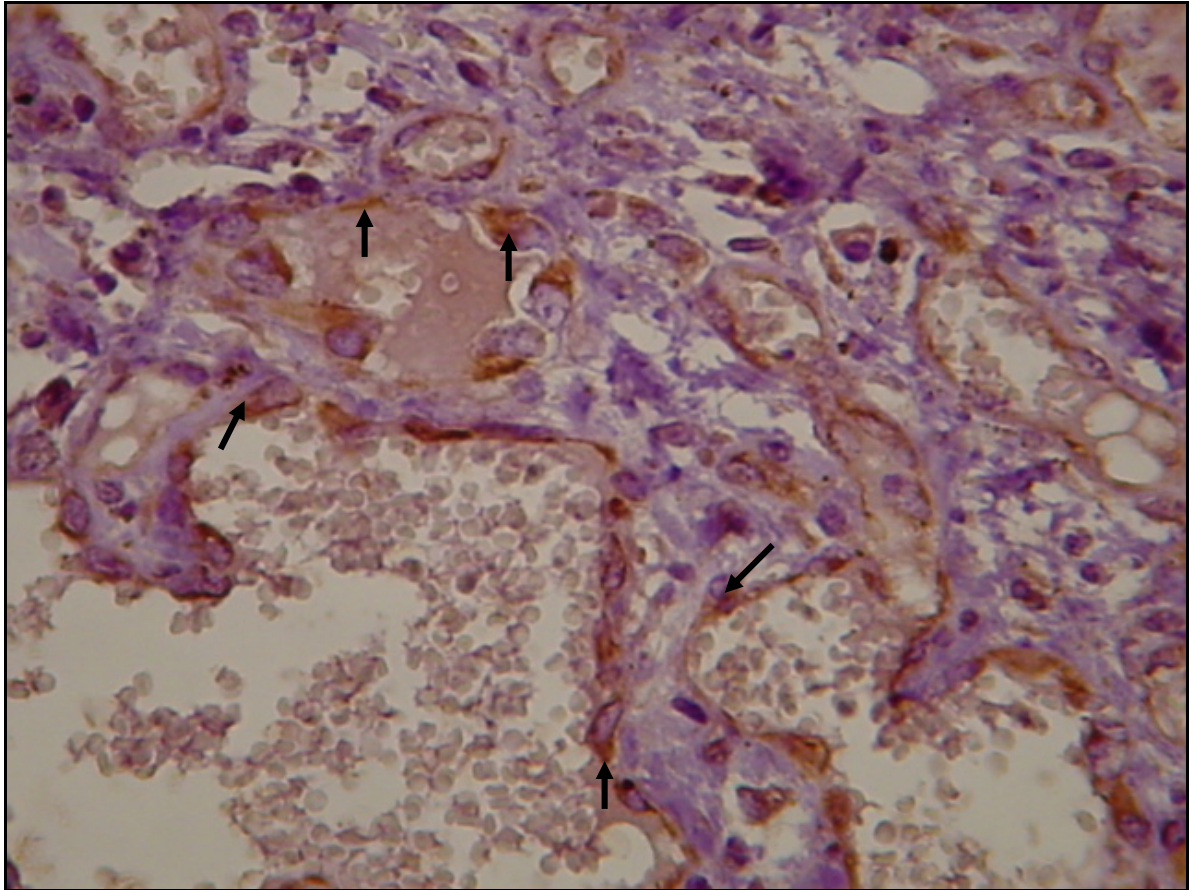


**Figura 4. Carcinoma, Anti-Citoqueratina positivo (100x). Reacción positiva al anticuerpo de color marrón en el citoplasma de células epiteliales malignas (flechas).**

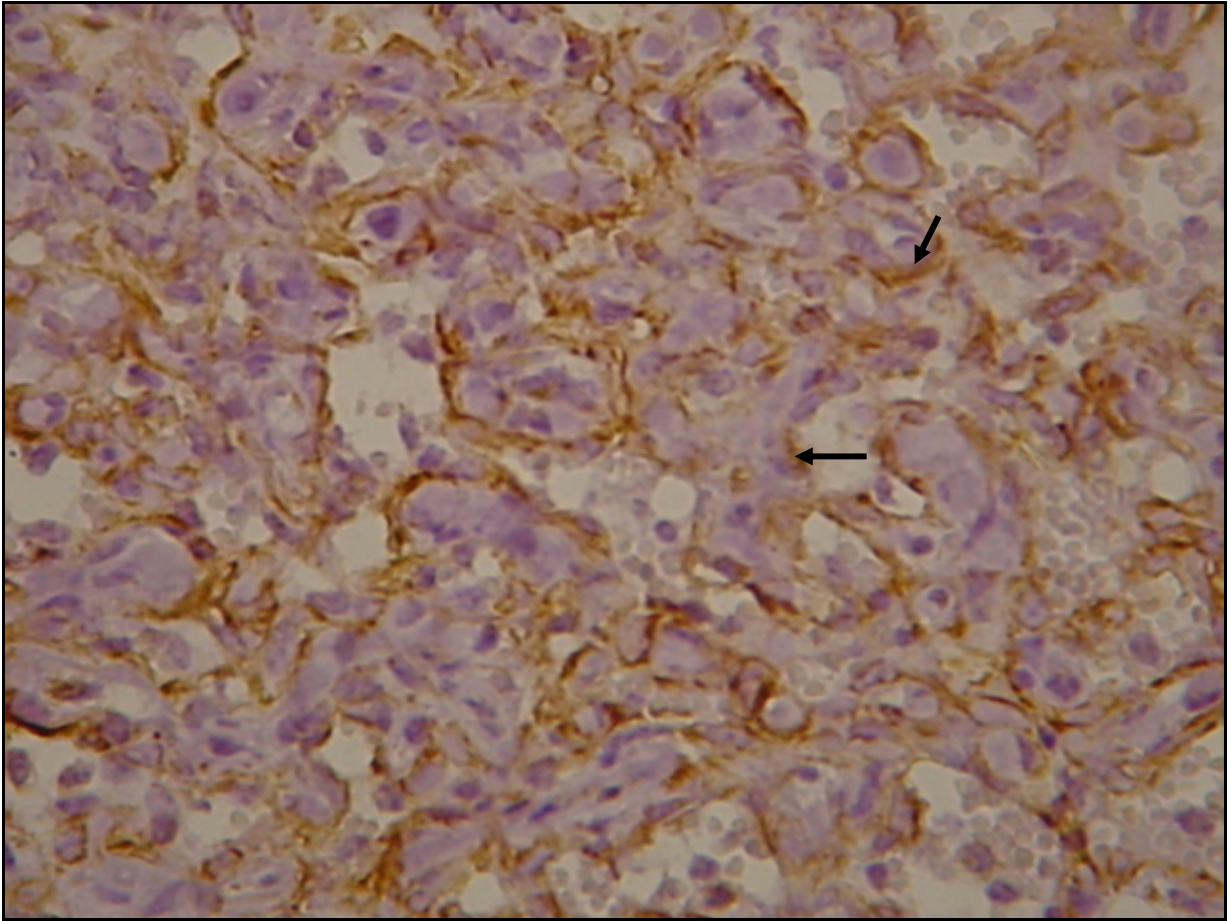


**Figura 5. Hemangiosarcoma, Hematoxilina-Eosina**

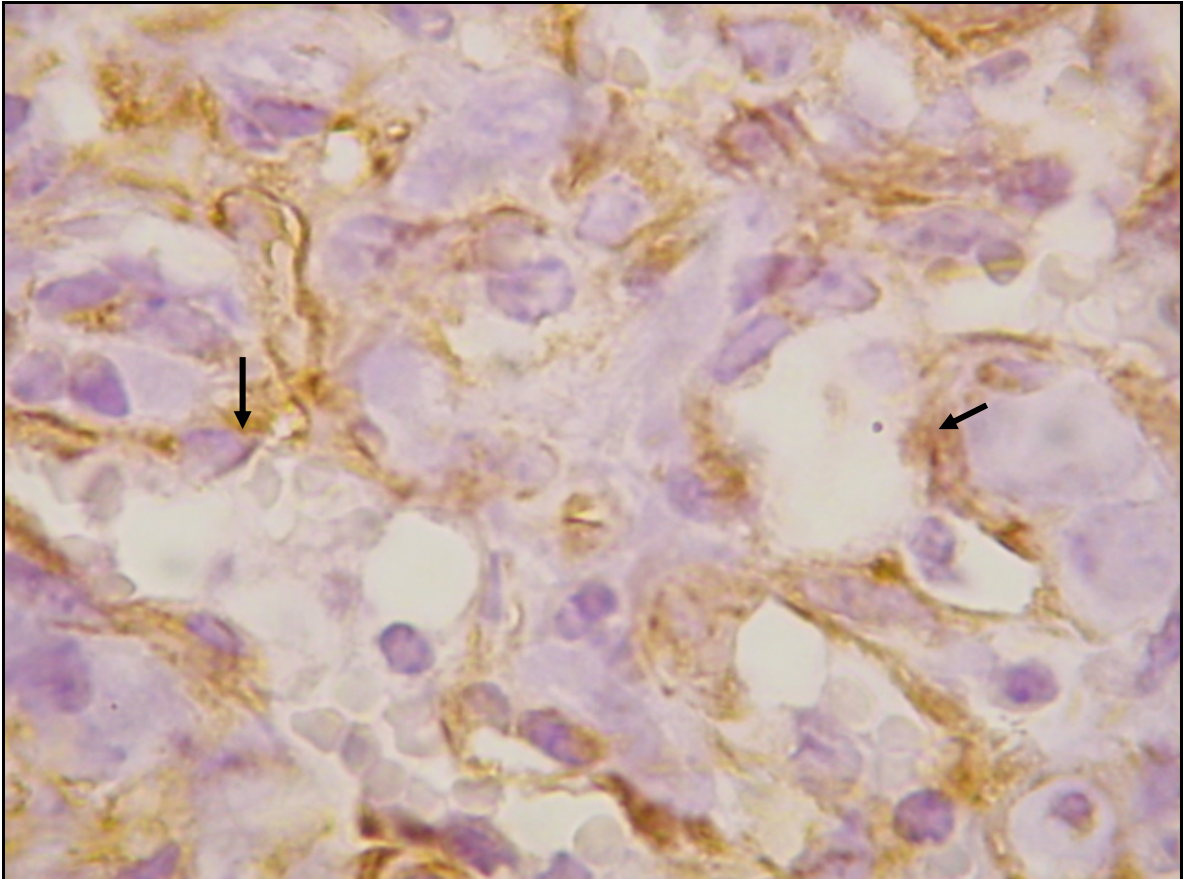




**Figura 6. Hemangiosarcoma, Anti-Vimentina positivo (40x). Reacción positiva al anticuerpo de color marrón en el citoplasma de células endoteliales malignas (flechas).**

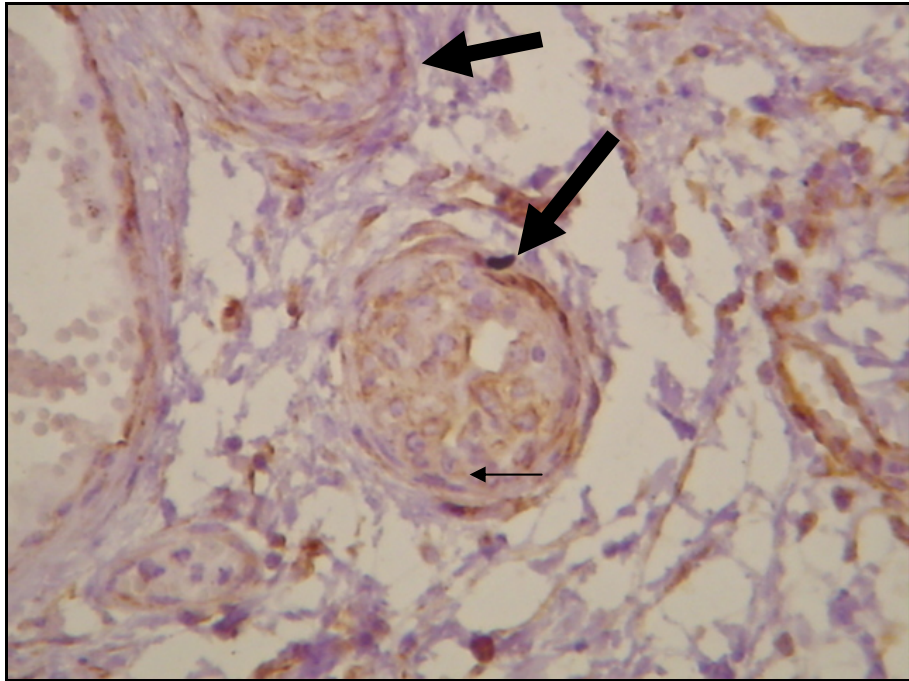


**Figura 7. Hemangiosarcoma, Anti-Vimentina positivo (40x). Reacción positiva al anticuerpo de color marrón en el citoplasma de células endoteliales malignas (flechas).**

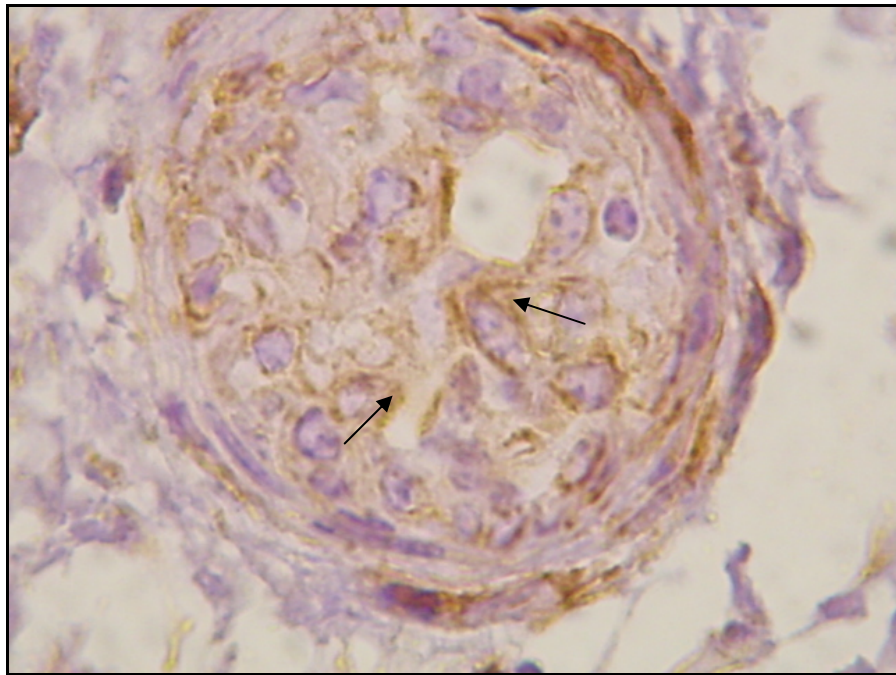


**Figura 8. Hemangiosarcoma, Anti-Vimentina positivo (100x). Reacción positiva al anticuerpo de color marrón en el citoplasma de células endoteliales malignas (flechas)**

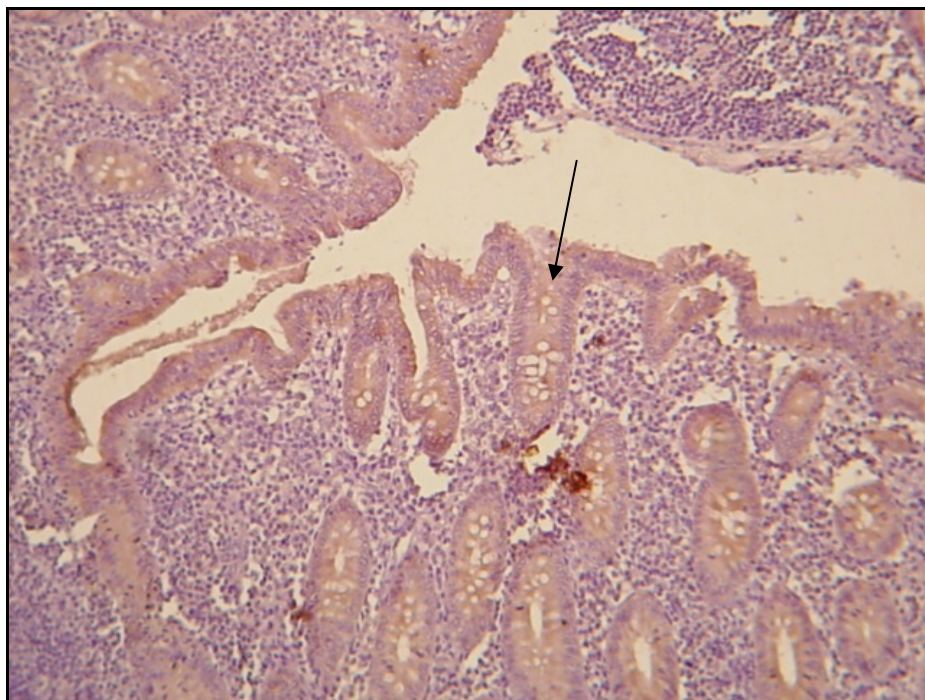




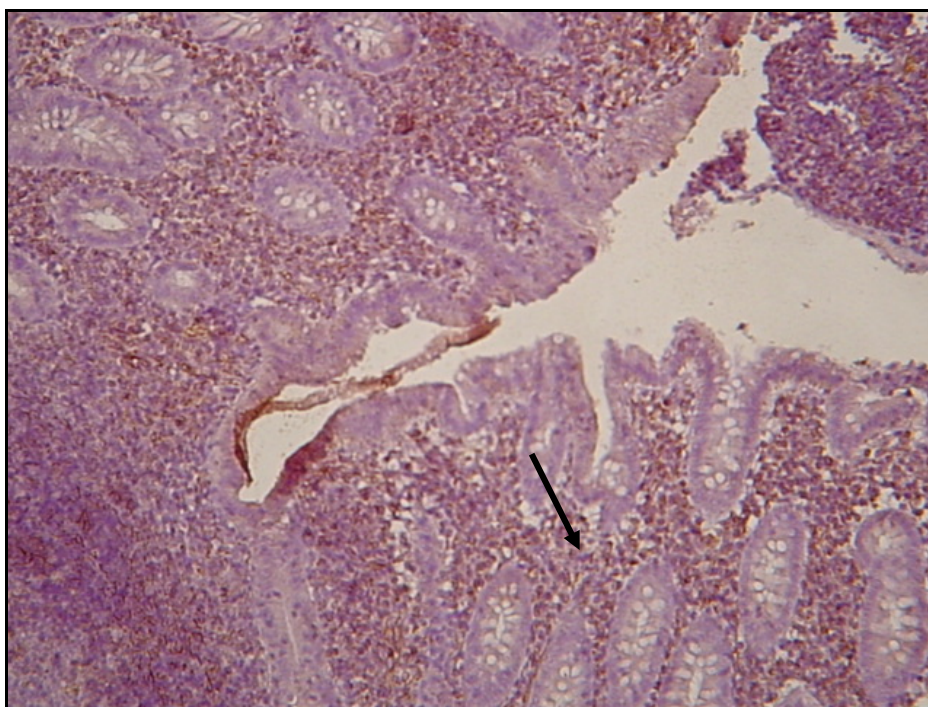
**Figura 9. Nidos Angioblásticos, Anti-Vimentina positivo (40x).**



**Figura 10. Nido Angioblástico, Anti-Vimentina positivo (100x)**



**Figura 11. Control Positivo, Anti-Citoqueratina positivo (10x)**



**Figura 12. Control Positivo, Anti-Vimentina positivo (10x)**

## **V. DISCUSIÓN**

En el presente estudio se decidió aplicar la Técnica de Inmunohistoquímica debido a la variedad de neoplasias vesicales, a los diferentes grados de malignidad así como los diferentes orígenes blastodérmicos (hasta dos en un mismo tejido). Esta técnica nos permite hacer un seguimiento del comportamiento celular además de corroborar el diagnóstico histopatológico realizado en el estudio anterior por Gonzáles (2003), definiendo principalmente el origen de las células neoplásicas.

La inmunohistoquímica, técnica que ha producido un gran impacto dentro del mundo de la patología, fue estandarizada para su uso en medicina veterinaria en nuestro país mediante este estudio. Asimismo, se usó como modelo de estudio a la HVEB para la estandarización de la técnica debido a las múltiples lesiones de tipo neoplásico de diferentes estirpes celulares, que se presentan en una misma fracción de muestra vesical.

Según lo citado por Elias (1990) y Boenisch (2001), el punto crítico en todo estudio inmunohistoquímico es la fijación, debido a que la formalina disminuye o elimina la inmunoreactividad de muchos antígenos tisulares, como de las citoqueratinas y vimentina, considerando como el tiempo óptimo de fijación de 12 a 24 horas. Las muestras problemas utilizadas en la presente investigación fueron recolectadas por Gonzáles (2003) y fijadas en formol al 10% entre 3-5 meses

antes del estudio aproximadamente, a diferencia de la muestra control positivo (apéndice humano sin procesos patológicos), que fue fijada en formol al 10% entre 24 a 48 horas. Esto sugiere que el tiempo de fijación influye levemente en la inmunoreactividad de los antígenos utilizados, porque se encontró en las muestras problema una coloración marrón ligeramente más tenue comparada con la muestra control. Lo que se debe resaltar es que se pudo devolver la inmunoreactividad gracias a la recuperación antigénica.

El procedimiento normalmente utilizado para suprimir la actividad de la peroxidasa endógena en tejidos fijados con formalina es la incubación de los cortes con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 a 10 minutos. Diferente al aplicado en el protocolo del presente trabajo de investigación, se utilizó peróxido de hidrógeno puro a 120 volúmenes por 20 minutos, presentando una buena saturación de las peroxidasas endógenas sin destrucción del tejido, quiere decir que se evitaron los falsos positivos.

Borzacchiello *et al.* (2001), aplicaron la Técnica de Inmunohistoquímica utilizando tres anticuerpos en contra de citoqueratina, vimentina y proteína S-100 sobre una muestra de un carcinoma *in situ* de la vejiga urinaria de una vaca con HVEB que consumía *P. aquilinum*, se encontró que todas las células neoplásicas fueron negativas para los anticuerpos de la vimentina y la proteína S-100, pero positivas para el anticuerpo de las citoqueratinas. Hallazgo similar al presente estudio en que todas las células neoplásicas diagnosticadas como “carcinomas”, resultaron positivas a la Anti-Citoqueratina y negativas a la Anti-Vimentina, demostrando su gran especificidad.

En el estudio realizado por Martín de las Mulas *et al.* (1995) sobre la inmunocaracterización de diferentes tumores orgánicos en felinos, utilizaron los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de los filamentos intermedios: citoqueratinas de bajo y alto peso molecular, vimentina, desmina, AGFP y neurofilamentos; resultando que los carcinomas reaccionaron con los anticuerpos de las citoqueratinas y los hemangiosarcomas con el anticuerpo de la vimentina.

Encontrando de una manera similar en el presente trabajo, con respecto a los hemangiosarcomas que reaccionaron positivamente a la Anti-Vimentina y los carcinomas a la Anti-Citoqueratina.

Según lo reportado por Gonzáles (2003), los Nidos Angioblásticos son estructuras conformadas por vasos sanguíneos tortuosos en proliferación, que presentan células endoteliales con actividad exacerbada, planteando que serían fuente de futuros procesos neoplásicos vasculares; confirmándose con el presente estudio que son células endoteliales, debido a que estas reaccionaron a la Anti-Vimentina y no a la Anti-Citoqueratina, quiere decir que son de origen mesenquimal, concluyéndose que estas formaciones son estados primigenios del hemangiosarcoma.



## **VI. CONCLUSIONES**

1. Se estandarizó la Técnica de Inmunohistoquímica para su aplicación en Medicina Veterinaria de nuestro medio en muestras de tejido bovino, es una prueba diagnóstica rápida, de fácil aplicación y con una gran sensibilidad.
2. El tiempo de fijación posible para muestras positivas a neoplasias epiteliales y mesenquimales de bovinos con HVEB para aplicar la Técnica de Inmunohistoquímica es de 3-5 meses.
3. Se determinó el origen epitelial de las células neoplásicas epiteliales utilizando el anticuerpo Anti-Citoqueratina y el origen mesenquimal de las células neoplásicas no epiteliales utilizando el anticuerpo Anti-Vimentina.
4. Los llamados “Nidos Angioblásticos” son de origen mesenquimal, lo que sugiere que son una fase primigenia de los hemangiosarcomas.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Poner en práctica este protocolo de Inmunohistoquímica para otros trabajos de investigación, ya que esta es la primera vez que se aplica dicha técnica en el campo de la medicina veterinaria en nuestro medio, dando muy buenos resultados.
- Utilizar la variedad de anticuerpos existentes en el mercado para el diagnóstico definitivo de neoplasias de otras estirpes celulares.
- Desarrollar más trabajos de investigación referente a la hematuria vesical enzoótica bovina, en el intento de llegar a conocerla mejor y controlarla en el ganado bovino.
- Investigar la implicancia en el área de salud pública en las zonas de nuestro país, donde es frecuente la presentación de la hematuria vesical enzoótica bovina, como en Oxapampa-Pasco.

## VIII. LITERATURA CITADA

1. **Alonso-Amelot ME. 1999.** Helecho macho, salud animal y salud humana. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 16(5): 528-541.
2. **Alonso-Amelot ME, Castillo U, De Jongh F. 1993.** Passage of the bracken fern Carcinogen Ptaquiloside into Bovine Milk. Lait. 73: 323-332.
3. **Alonso-Amelot ME, Rodolfo-Baechler S, Jaimes-Espinoza R. 1995.** Comparative dynamics of ptaquiloside and pterodin B in the two varieties (caudatum and arachnoideum) of Neotropical Bracken Fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn). Biochemical Systematics and Ecology. 23: 709-716.
4. **Amstutz H, Anderson D, Armour J, Jeffcott L, Loew F, Wolf A. 1998.** The Merck Veterinary Manual. 8th Ed. Merck & Co., INC – White House Station. New York (USA). p. 2026-2027.
5. **Asumi N, Battifora H. 1987.** The distribution of vimentin and keratin in epithelial and non epithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin- and alcohol-fixed tumors. Am J Clin Pathol. 88: 286-96.
6. **Blood DC, Radostits DM. 1992.** Medicina Veterinaria. 7ma Ed., Interamericana Mc Graw Hill. México. p. 1421-1422, 1545-1546.
7. **Boenisch T. 2001.** Manual DAKO: Métodos inmunohistoquímicos de coloración. 3ra Ed., Dako Corporation, Carpintería. California. USA. p. 5-32.

8. **Borzacchiello G, Ambrosio V, Galato P, Poggiali F, Venuti A, Roperto F. 2001.** The Pagetoid Variant of Urothelial Carcinoma In Situ of Urinary Bladder in a Cow. *Vet Pathol* 38:113-116.
9. **Bourne JA. 1983.** Handbook of immunoperoxidase staining methods. 1st Ed., Immunocytochemistry Laboratory Dako Corporation. USA. p. 7-29.
10. **Campo MS, Jarrett WFH, Barron R, O'Neil BW, Smith KT. 1992.** Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Res* 52: 6898-6904.
11. **Carlyle TJ, Duncan RH. 1990.** Patología Veterinaria. 1ra Ed., Editorial Hemisferio Sur. Montevideo. p. 1523-1524.
12. **Cooper GM. 2002.** La Célula. 2da Ed., Editorial Marbán, S.L. España. p. 441-443.
13. **DakoCytomation, Inc.** Prospecto, Policlonal Rabbit Anti-Keratin for Wide Spectrum Screening (Code N° N1512). Carpinteria. USA.
14. **DakoCytomation, Inc.** Prospecto, Monoclonal Anti-Cow Vimentin Clone VIM 3B4 (Code N° N1583). Carpinteria. USA.
15. **Elias JM. 1990.** Immunohistopathology. A practical Approach to Diagnosis. 1st Ed., Editorial American Society of Clinical Pathologists. Chicago, USA. p. 1-11, 91-111.
16. **Evans WC. 1976.** Bracken thiaminase-mediated neurotoxic syndromes. *Bot. J. Linnean Soc.* 73:113-131.
17. **Gimeno E, Massone AR, Portiansky EL. 2002.** Introducción a las Técnicas de inmunohistoquímica y aplicaciones en medicina veterinaria. Decimocuarto Curso Internacional de PosGrado en Técnicas de Inmunohistoquímica, Lectinohistoquímica y Microscopía Electrónica. Univ. Nac. La Plata. Fac. Cien. Vet. 1: 64-80.
18. **González CE. 2003.** Frecuencia y caracterización anatomo-histopatológica de las lesiones encontradas en bovinos con hematuria en Oxapampa-Pasco. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 72 p.

19. **Gown AM, Bacchi CE. 1992.** Diagnostic Immunocytochemistry of Solid Tumors. Fall Meeting American Society of Clinical Patologists. Las Vegas. Nevada. 1: 2-15.
20. **Hirayama T. 1979.** Diet and Cancer. Nutr. Cancer.1: 67-81.
21. **Hirono I, Aiso S, Yamaji T, Mori H, Yamada K, Niwa H, Ojiva M, Wakamatsu K, Kigoshi H, Niiyama K, Uosaki Y. 1984.** Carcinogenicity in rats of ptaquiloside isolated from bracken. Gann. 75:833-836.
22. **Jubb K, Kennedy P, Palmer N. 1991.** Patología de los animales domésticos. 5ta Ed. Editorial Hemisferio Sur. Uruguay. p. 453-458.
23. **Kushida T, Uesugi M, Sugiura Y, Kigoshi H, Tanaka H, Ojiva M, Yamada M. 1994.** DNA damage by Ptaquiloside a potent bracken carcinogen: detection of selective strand breaks and identification of DNA cleavage Products. J. Am. Chem. Soc. 116.
24. **Lodish H, Berk A, Zipursky L. 2001.** Molecular Cell Biology. 4th Ed., Editorial Media Connected. p. 836-838.
25. **López H. 1983.** Incidencia de la Hematuria Enzoótica del ganado vacuno en la provincia de Oxapampa. Tesis Bachillerato. Fac. Cienc. Agropec. Univ. Nac. Daniel Alcides Carrión. Oxapampa. 50 p.
26. **Marliere CA, Santos RC, Galvao MA, Soares JF, Evangelista CL, Gomez RF. 1998.** Ingestato de Broto de samambaia e risco de cancer esófago e estomago na regio de Ouro Preto M. G. Revista Brasileira de Cancerologia. 44 (3): 225-229.
27. **Martín de las Mulas J, Espinosa de los Monteros A, Carrasco L, van Niel M, Fernández A. 1995.** Immunohistochemical distribution pattern of intermediate filament proteins in 50 feline neoplasms. Veterinary Pathology. 32 (6): 692-701.
28. **Mills B. 1980.** Métodos histotecnológicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. p. 253-257.
29. **Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepeler R. 1982.** The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cell. Cell. 31(1):11-24.

30. **Moulton JE. 1978.** Tumors in domestic animals. 2nd Ed., University of California. Los Angeles (EE.UU). p. 295-305.
31. **Murphy G, Lawrence W, Lenkard RE. 1996.** Oncología Clínica. Manual de la American Cancer Society. 2da Ed., Publicación Científica N° 559. Organización Panamericana de la Salud. p. 94 – 96.
32. **Osborn M, Weber K. 1983.** Tumor diagnosis by intermediate filament typing: A novel tool for surgical pathology. Lab. Invest. 48(4):372-94.
33. **Pamukcu AM. 1974.** Tumours of the urinary bladder. International Histological Classification of Tumours of Domestic Animals. Bull Wld Hlth Org. World Health Organization. Geneva (Switzerland). 50(4): 45-52.
34. **Pamukcu AM, Price JM, Bryan GT. 1976.** Naturally occurring and bracken-fern-induced bovine urinary bladder tumors. Clinical and morphological characteristics. Veterinary Pathology. 13 (2): 110-122.
35. **Pardo J, Panizo A, Martínez L. 1998.** Valoración del sistema de polímeros de dextrano EnVision (PDE) en la detección inmunohistoquímica. Rev Esp Patol. 31 (1): 9-16.
36. **Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002.** Medicina Veterinaria: Tratado de las Enfermedades del Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino y Equino. 9na Ed. Editorial Mc Graw Hill – Interamericana. Madrid, España. p. 1971-1974.
37. **Rojas M, Martínez-García F, Cobo C, Palacios J, Nistal M, Regadera J. 1998.** Keratinas: Biología Celular y significado funcional normal y patológico. Rev. Chil. Anat. 16 (1): 15-31.
38. **Sedano E, Neira C, Vilcaromero ME. 2005.** Manual de Prácticas de Histoquímica de la UNMSM. 2da Ed., p. 106-109. Lima-Perú.
39. **Shahin M, Smith BL, Prakash AS. 1999.** Bracken carcinogens in the human diet. Mutat Res. 443 (1-2): 69-79.
40. **Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliabue E, Pezzella F, Ghirelli C, Tornielli S, Sard L, Huebner K, Pierotti MA, Croce CM, Pilotti S. 1998.** Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. Cancer Res 58:5032-5037.

41. **Sun TT, Eichner R, Schermer A, Cooper D, Nelson WG, Weiss RA. 1984.** Classification of expression and possible mechanisms of evolution of mammalian epithelial keratins: a unifying model. *Cancer Cells*. 1: 169.
42. **Tokarnia CH, Döbereiner J, Peixoto PV. 2000.** Plantas Tóxicas de Brasil. 1ra Ed., Editora Helianthus, Rio de Janeiro. Brasil. p. 125-128.
43. **Tomizawa Y, Nakajima T, Cono T, Saito R, Yamaguchi N, Yokota J. 1998.** Clinicopathological significance of FHIT protein expression in stage I non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res*. 58:5478-5483.
44. **Tseng SC, Jarvinen MJ, Nelson WG, Huang JW, Woodcock-Mitchell J, Sun TT. 1982.** Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation monoclonal antibody studies. *Cell*. 30(2):361-72.
45. **Van Noorden S, Polak JM. 1983.** Immunocytochemistry: Practical Applications in Pathology and Biology. 1st Ed., Editorial John Wright & Sons Ltd. London, Inglaterra. p. 11 – 33.
46. **Vargas PP, do Nascimento TF, Barros CSL, Hubinger CT. 2003.** Histopathological aspects of Bovine Enzootic Hematuria in Brazil. *Pesq. Vet. Bras*. Rio de Janeiro. 23 (2): 65-81.
47. **Villalobos-Salazar J, Meneses A, Rojas JL, Mora J, Herrero M. 1989.** Bracken derived carcinogens as affecting animal and human health in Costa Rica. *Spec. Publ. Int. Bracken Group. Geography Dep. Univ. College N. Wales, Aberystwyth, Wales UK*. 1: 40-51.
48. **Villalobos-Salazar J, Hernández H, Salazar G, Meneses A. 2000.** Influence of maturation stage and altitude on the levels of Ptaquiloside in bracken fern in Costa Rica. *Proceedings of the IV International Bracken Conference, Manchester, July 20-23*: 68-74
49. **Wiesner E. 1973.** Enfermedades del ganado bovino. 1ra Ed., Editorial Acribia. Zaragoza, España. P 207.